

„UNTERSUCHUNGEN
ZUR THROMBOZYTENADHÄSION
AN INSOLUBILISIERTES KOLLAGEN“

Diethelm Tschöpe

Diss. München
1984



Aus dem Institut für Klinische Chemie
am Klinikum Großhadern der Universität München

Direktor: Prof. Dr. M. Knedel

"UNTERSUCHUNGEN ZUR THROMBOZYTENADHÄSION AN
INSOLUBILISIERTES KOLLAGEN"

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Diethelm Tschöpe
aus Beuel
München 1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. W. Vogt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Knedel

Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS

I	Einleitung	1
1.1	1.1.1	2
1.2	1.2.1	3
1.3	1.3.1	4
2	Meinen Eltern	5
2.1	2.1.1	6
2.2	2.2.1	7
2.3	2.3.1	8
2.4	2.4.1	9
2.5	2.5.1	10
2.6	2.6.1	11
2.7	2.7.1	12
2.8	2.8.1	13
2.9	2.9.1	14
2.10	2.10.1	15
2.11	2.11.1	16
2.12	2.12.1	17
2.13	2.13.1	18
2.14	2.14.1	19
2.15	2.15.1	20
2.16	2.16.1	21
2.17	2.17.1	22
2.18	2.18.1	23
2.19	2.19.1	24
2.20	2.20.1	25
2.21	2.21.1	26
2.22	2.22.1	27
2.23	2.23.1	28
2.24	2.24.1	29
2.25	2.25.1	30
2.26	2.26.1	31
2.27	2.27.1	32
2.28	2.28.1	33
2.29	2.29.1	34
2.30	2.30.1	35
2.31	2.31.1	36
2.32	2.32.1	37
2.33	2.33.1	38
2.34	2.34.1	39
2.35	2.35.1	40
2.36	2.36.1	41
2.37	2.37.1	42
2.38	2.38.1	43
2.39	2.39.1	44
2.40	2.40.1	45
2.41	2.41.1	46
2.42	2.42.1	47
2.43	2.43.1	48
2.44	2.44.1	49
2.45	2.45.1	50
2.46	2.46.1	51
2.47	2.47.1	52
2.48	2.48.1	53
2.49	2.49.1	54
2.50	2.50.1	55
2.51	2.51.1	56
2.52	2.52.1	57
2.53	2.53.1	58
2.54	2.54.1	59
2.55	2.55.1	60
2.56	2.56.1	61
2.57	2.57.1	62
2.58	2.58.1	63
2.59	2.59.1	64
2.60	2.60.1	65
2.61	2.61.1	66
2.62	2.62.1	67
2.63	2.63.1	68
2.64	2.64.1	69
2.65	2.65.1	70
2.66	2.66.1	71
2.67	2.67.1	72
2.68	2.68.1	73
2.69	2.69.1	74
2.70	2.70.1	75
2.71	2.71.1	76
2.72	2.72.1	77
2.73	2.73.1	78
2.74	2.74.1	79
2.75	2.75.1	80
2.76	2.76.1	81
2.77	2.77.1	82
2.78	2.78.1	83
2.79	2.79.1	84
2.80	2.80.1	85
2.81	2.81.1	86
2.82	2.82.1	87
2.83	2.83.1	88
2.84	2.84.1	89
2.85	2.85.1	90
2.86	2.86.1	91
2.87	2.87.1	92
2.88	2.88.1	93
2.89	2.89.1	94
2.90	2.90.1	95
2.91	2.91.1	96
2.92	2.92.1	97
2.93	2.93.1	98
2.94	2.94.1	99
2.95	2.95.1	100

I N H A L T S Ü B E R S I C H T

	Seite
1 EINLEITUNG und THEMENSTELLUNG	1
2 MATERIAL und METHODEN	5
2.1 Gewinnung von venösem Vollblut	5
2.2 Thrombozytenpräparation	5
2.3 Thrombozytenzahlbestimmung	6
2.4 Verteilungskurven der Thrombozytenvolumina im PRP	7
2.5 Herstellung von Kollagen-Agarose	9
2.6 Durchführung des Kollagen-Agarose-Testes	13
2.7 Immunfluoreszenzdarstellung von Thrombozyten	15
2.8 Untersuchte Kollektive	17
2.9 Statistik	19
3 ERGEBNISSE und DISKUSSION	21
3.1 Untersuchungen zur Thrombozytenzählung	21
3.2 Der Kollagen-Agarose-Test. Untersuchungen zum Testsystem	27
3.2.1 Abhängigkeit des Kollagen-Agarose-Testes von der Thrombozytenausgangszahl	29
3.2.1.1 Bezugskurve und Referenzbereich	35

	Seite
3.2.2	Streubreite des Kollagen-Agarose-Testes 40
3.2.3	Einfluß der Kollagen-Agarose-Konzentration im Testansatz auf das Testergebnis 44
3.2.4	Einfluß der Standzeit nach Blutentnahme auf das Testergebnis 47
3.2.5	Einfluß der Inkubationsbedingungen auf das Testergebnis 48
3.2.6	Einfluß der Standzeit des Testansatzes nach Inkubation auf das Testergebnis 51
3.2.7	Halbbarkeitskontrolle einer Kollagen-Agarose-Präparation 54
3.3	Studien mit dem Testsystem zum "in vitro"-Verhalten der Thrombozyten 56
3.3.1	pH-Wert-Registrierung 56
3.3.2	Untersuchung zur Volumenverteilung von Thrombozyten im PRP vor und nach Testdurchführung 59
3.3.3	Vergleich des Einflusses von Heparin und Natrium-Citrat-Lösung auf die Thrombozytenreagibilität 63
3.3.4	Vergleich von Kollagen-Agarose-Testergebnissen mit anderen Thrombozytenfunktionsuntersuchungen 70
3.3.4.1	Beziehung zwischen induzierter Aggregation nach BORN und Kollagen-Agarose-Test 71
3.3.4.2	Beziehung zwischen Thrombozytenausbreitung und Kollagen-Agarose-Test 73
3.3.5	Darstellung des Testeffektes 75

		Seite
3.4	Das Testsystem als Untersuchungsmethode. Patientenstudien	80
3.4.1	Kollektive	80
3.4.1.1	Diabetiker vom Typ I	81
3.4.1.2	Patienten mit verschiedenen Stoffwechsel- störungen	81
3.4.1.3	Patienten mit Hypertonus	81
3.4.1.4	Raucher	81
3.4.1.5	Patienten mit multifaktorieller Gefähr- dung	82
3.4.1.6	Patienten mit koronarer Herzkrankheit	82
3.4.1.7	Patienten mit verschiedenen vasoobstruk- tiven Erkrankungen	82
3.4.2	Verläufe	94
4	ZUSAMMENFASSUNG	111
5	LITERATUR	114

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

ABKÜRZUNGEN:

AS	=	Arbeitssuspension
AVK	=	Arterielle Verschlusskrankheit
KAT	=	Kollagen-Agarose-Test (-ergebnis)
KHK	=	Koronare Herzkrankheit
PFP	=	Plättchenfreies Plasma
PRP	=	Plättchenreiches Plasma
Thz	=	Thrombozyten
WW	=	Wiederholungswert

Geschützte Präparatenamen bzw. eingetragene Warenzeichen wurden nicht einheitlich mit R gekennzeichnet.

1 EINLEITUNG und THEMENSTELLUNG

Die verschiedenen Funktionen der Thrombozyten bei der Hämostase lassen sich folgenden übergeordneten Gesichtspunkten zuordnen (39, 49, 76, 87, 95):

- Abdichtung und Reparatur kleinerer physiologischer Endotheldefekte ohne plasmatische Gerinnung (Pseudo-endothelfunktion).
- Primärer Gefäßverschluß bei größeren Läsionen mit Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade.

Vorwiegend unter diesen Aspekten betrachten wir im Folgenden die Thrombozyten. Sie entstehen durch Abschnürung von Megakaryozyten des Knochenmarks und besitzen einen hochdifferenzierten, komplexen Stoffwechsel. Die Blutplättchen gleichen Rezeptoren, die auf chemische, mechanische und thermische Reize ansprechen. Durch Kontraktion, Relaxation und Sekretion von gespeicherten Mediatoren wie Prostaglandinen, Plättchenfaktoren und Proteinen antworten sie spezifisch auf solche Reize (88). Diese Leistungen sind mit dem Gesamtsystem der Hämostase so abgestimmt, daß die Thrombozyten die initiale Blutstillung und die Thrombusbildung vermitteln und steuern (Triggerfunktion).

Im einzelnen sind die Thrombozytenfunktionen folgendermaßen beschrieben (11, 63, 74, 76, 87, 88, 95, 102).

- Adhäsion, d.h. Haftung der Thrombozyten an fremden Oberflächen, insbesondere an körpereigenen Strukturproteinen wie Kollagen.



- Ausbreitung, d.h. Formänderung der Thrombozyten bei Aktivierung, insbesondere bei Kontakt mit Oberflächen.
- Agglomeration, d.h. reversible Thrombozytenanlagerung untereinander, die der viskösen Metamorphose vorausgeht.
- Aggregation, d.h. irreversible Thrombozytenverklebung untereinander (= visköse Metamorphose).
- Retraktion, d.h. thrombozytenvermittelte Zusammenziehung des Blutgerinnsels.

Störungen dieser Funktionen, d.h. Steigerung oder Verminderung, können bedeutsame Veränderungen der Hämostase bewirken:

Eine Verminderung der thrombozytären Leistungsfähigkeit ist Ursache von hämorrhagischen Diathesen. So ist beispielsweise bei der v. WILLEBRAND'schen Erkrankung, myeloproliferativen Syndromen sowie dem seltenen BERNARD-SOULIER Syndrom eine verminderte Thrombozytenfunktion nachgewiesen worden (42, 87, 95). Die Steigerung der Thrombozytenaktivität spielt wahrscheinlich in der Pathogenese thrombogener und vasoobstruktiver Erkrankungen eine Rolle (19, 22, 26, 30, 39, 53, 65, 87, 111). Krankheiten, bei denen eine solche thrombozytäre Beteiligung teils vermutet wird, teils gesichert ist, sind:

- Stoffwechselstörungen und allgemein vaskuläre Risikofaktoren wie z.B. Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Hypertonie et al.
- Vasoobstruktive Erkrankungen wie z.B. koronare Herzkrankheit, arterielle Verschlusskrankheit, Venenthrombosen et al.

Es besteht die Möglichkeit, zur Behandlung dieser thrombogenen Erkrankungen die gesteigerte Plättchenaktivität mit Pharmaka zu senken (29, 30, 32, 44, 56, 71, 76, 91). Voraussetzung hierfür sollte eine Objektivierung der Thrombozytenfunktion sein.

Die oben genannten Funktionen werden von verschiedenen Testverfahren geprüft (18, 22, 35, 36, 79). Der Plättchenretentionstest nach HELLEM, die induzierte Plättchenaggregation nach BORN (36, 102) oder Plättchenausbreitung nach MARX (64) bzw. nach BREDDIN (11) sind Beispiele weitverbreiteter "in vitro" - Untersuchungsmethoden. Darüber hinaus stehen als "in vivo" - Verfahren die Messung thrombozytenspezifischer Inhaltsstoffe wie β -Thromboglobulin (18, 69, 78, 79, 96) oder die Bestimmung zirkulierender Plättchenaggregate (2, 18, 79) zur Verfügung. Eine allgemein verbindliche, standardisierte Thrombozytenfunktionsdiagnostik gibt es zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch nicht. In unserem Laboratorium wurden bisher neben der Bestimmung der Thrombozytenzahl im Citratblut folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Induzierte Plättchenaggregation nach BORN
- Plättchenausbreitung nach BREDDIN
- Gerinnselretraktion
- Plättchenadhäsion nach BREDDIN

Alle diese Methoden können modernen, klinisch-chemischen Vorstellungen nicht genügen. Insbesondere die Bestimmung der Plättchenadhäsion nach BREDDIN lieferte schlecht reproduzierbare und damit unbefriedigende Ergebnisse. Es wurde daher notwendig, einen anderen Adhäsionstest einzuführen, der eine zuverlässige Beurtei-

lung sowohl von Zuständen gesteigerter wie verminderter Thrombozytenaktivität bei guter Durchführbarkeit gestattet und sich zur Kontrolle einer Antiaggregantientherapie eignet.

In der vorliegenden Arbeit wird geprüft, ob ein Testsystem auf der Basis insolubilisierten Kollagens (Kollagen-Agarose-Test, 36) diesen Anforderungen gerecht werden konnte und für ein hämostaseologisches Routinelabor adaptierbar ist.

Bei der Durchführung dieser Untersuchung sind Thrombozytenzahlen als Berechnungsgrundlage des Testergebnisses von besonderer Bedeutung. Obwohl für die Bestimmung der Thrombozytenzahl eine große Zahl verschiedener Methoden beschrieben ist (27, 107), ist sie jedoch immer noch hinsichtlich Präzision und Richtigkeit eine sehr problematische Laborbestimmung. Wir führten daher ergänzend Untersuchungen zur Thrombozytenzählung durch, um die Präzision der von uns verwendeten Methode zu ermitteln und ihren Einfluß auf das Untersuchungsergebnis im Kollagen-Agarose-Test abschätzen zu können.

2 M A T E R I A L u n d M E T H O D E N

2. 1

Gewinnung von venösem Vollblut

Bei nüchternen Probanden wurde nach glatter Punktion einer peripheren Vene Blut in die mit Antikoagulans vorbereitete Einmalspritze luftblasenfrei aspiriert und sofort durchgemischt. Als Antikoagulantien verwendeten wir Natriumcitratlösung (3,13 % Natriumcitrat • 2H₂O, ph = 7,5) im Verhältnis 1:10 (ein Teil Natriumcitrat + neun Teile Blut) bzw. Heparin (Thrombophob^R, 5000 I.E. Heparin/ml) im Verhältnis 1:100. Das ungerinnbare Blut wurde bis zur weiteren Verwendung in verschlossenen Polystyrolröhrchen ca. 60 Minuten bei 20 °C aufbewahrt.

2. 2

Thrombozytenpräparation

1. Plättchenreiches Plasma (PRP)

Die gut durchmischte Vollblutprobe wurde 15 Minuten bei 20 °C und 1000 U/min (ca. 120 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Polystyrolröhrchen abpipettiert. Hierbei möglicherweise mitpipettierte Erythrozyten aus dem Blutkuchen wurden durch erneutes Zentrifugieren bei ca. 120 g und Raumtemperatur (20°C) eliminiert. Der Überstand wurde in ein frisches Plastikröhrchen dekantiert und als plättchenreiches Plasma weiterverarbeitet.

2. Plättchenfreies Plasma (PFP)

Das nach Herstellung von plättchenreichem Plasma verbleibende Vollblut wurde 10 Minuten bei 4 °C und 4000 U/min (ca. 2000 g) zentrifugiert. Der partikelfreie Überstand wurde in ein frisches Polystyrolröhrchen pipettiert und als Verdünnungsmedium weiterverwendet.

Von uns üblicherweise eingesetztes PRP wurde dabei mit PFP auf etwa 300 000 Thrombozyten/μl eingestellt.

2. 3

Thrombozytenzahlbestimmung

Thrombozytenzahlen bestimmten wir mit der Kammerzählung im Phasenkontrastmikroskop:

20 μl des jeweils präparierten plättchenreichen Plasmas wurden in ein mit 2 ml Hämolyseagens gefülltes Thrombo Plus^R-Röhrchen (Fa. Sarstedt) pipettiert. Nach guter Durchmischung wurde eine NEUBAUER-Kammer ("improved, bright line") beschickt. Vor der Auszählung des Kammerinhalts im Phasenkontrastmikroskop (Fa. Zeiss, "Standard") erfolgte eine zehnminütige Sedimentation der Thrombozyten in der feuchten Kammer. Dann wurden 2 x 25 Gruppenquadrate ausgezählt, die Zählwerte gemittelt und mit 1000 multipliziert, um die Thrombozytenzahl pro Mikroliter angeben zu können.

$$\text{Thrombozytenzahl pro Mikroliter} = \frac{\text{Zählwert 1} + \text{Zählwert 2}}{2} \times 1000$$

2. 4

Verteilungskurven der Thrombozytenvolumina im PRP

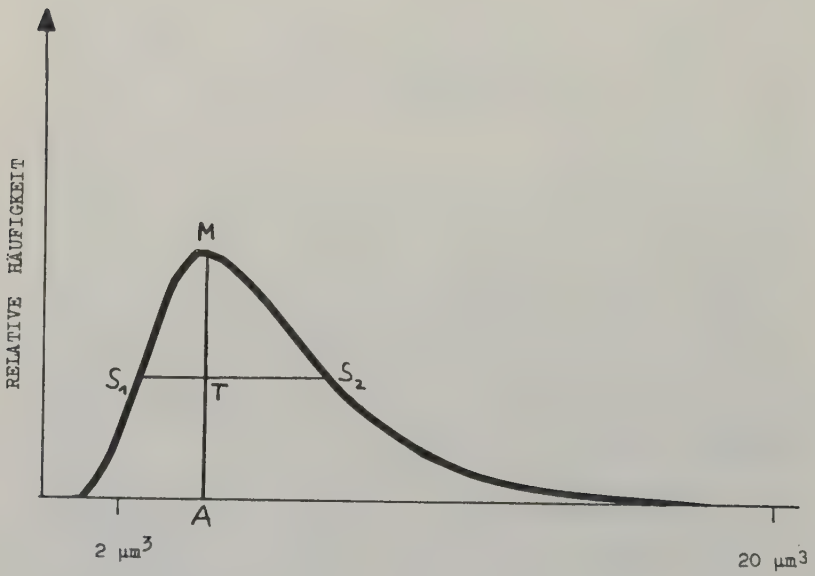
Zur Berechnung und Darstellung von Thrombozytenvolumenverteilungskurven verwendeten wir einen elektronischen Zellzähler (Coulter Counter S Plus):

44,7 μ l plättchenreichen Plasmas wurden in 10 ml Isoton^R-Lösung pipettiert und schonend durchmischt. Die in dieser Verdünnungssuspension enthaltenen Thrombozyten wurden dann vom Gerät gezählt und die entstehenden Meßimpulse gespeichert. Ihre Größenverteilung ließ sich dann auf einem von der Herstellerfirma normierten Meßblatt, dessen Abzisse nach Thrombozytenvolumina skaliert war, nach den relativen Häufigkeiten der einzelnen Größenklassen ausplotten.

Das so entstandene Histogramm, dem das Gerät automatisch einen Graph anpaßte, orientierte über die Häufigkeitsverteilung der Thrombozytenvolumina in der Meßprobe. Abb. 1 zeigt schematisch einen solchen Kurvenzug und die zu seiner Auswertung herangezogenen Orientierungspunkte und Strecken (AM, S_1S_2 , S_1I , TS_2). Die Spreizung der beiden Zeichenkanäle war variabel, wurde aber nach einmaliger Justierung nicht mehr verändert.

Abb.1

Schematisierte Volumenverteilungskurve von Thrombozyten



2. 5

Herstellung von Kollagen - Agarose

Das von GROTHEMEYER bzw. HEENE, MATTHIAS (36,41) angegebene Verfahren zur Herstellung von Kollagen-Agarose haben wir unter Berücksichtigung der industriellen Bearbeitungsanleitung für CNBr-aktivierte Sepharose (50), wie in Abbildung 2 dargestellt, folgendermaßen modifiziert:

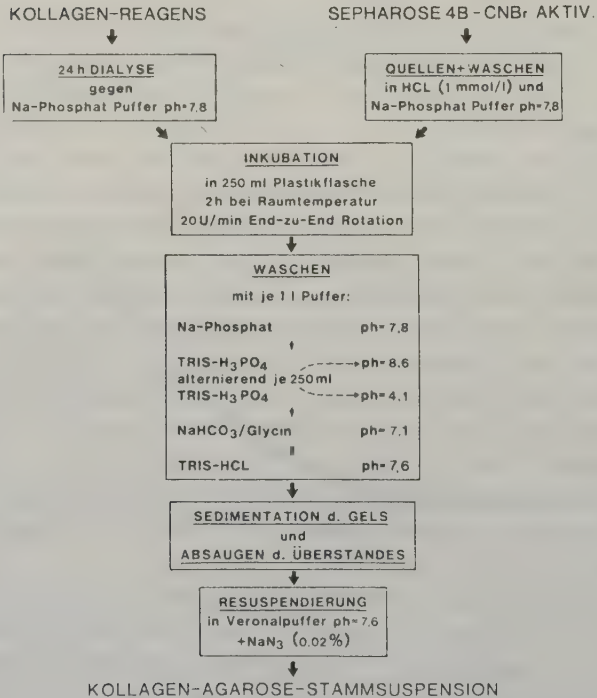
Kollagen-Reagenz Horm^R (Fa. Hormonchemie), das 24 Stunden gegen Natrium-Phosphat Puffer (pH = 7,8) dialysiert worden war und CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Fa. Pharmacia), die in Salzsäure (1 mmol/l) und dann in Natrium-Phosphat Puffer (pH = 7,8) aufgequollen und gewaschen worden war, inkubierten wir zusammen in einer 250 ml Polypropylen-Flasche für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Ein Verhältnis von 1 mg Kollagen pro ml gequollenem Sepharose-Gel betrachteten wir als ausreichend, da sich in mehreren Präparationen bei der mikroskopischen Kontrolle zeigte, daß die gesamte Sepharose-Kugeloberfläche mit Kollagenfibrillen vernetzt war. Durch diese gegenüber der Herstellerempfehlung (50) gesenkte Kollagen-Konzentration wurde die Gefahr einer Verunreinigung der Präparation durch freies Kollagen reduziert.

Während der Inkubation wurde das Reaktionsgemisch bei 20 U/min auf einem "Roto-Shake" (Modell: Kühner, Fa. Braun) End-zu-End rotiert.

An die Inkubation schloß sich ein ausgiebiger Waschvorgang an. Wir gingen dabei so vor, daß ein Gefäßwechsel nicht notwendig war, um Verluste an Präparationssubstanz möglichst zu vermeiden. Dazu wurde die Kollagen-Agarose in der Plastikflasche im jeweiligen Waschpuffer resuspendiert und anschließend zur Sedimentation stehen gelassen. Der Überstand wurde dann mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Abb. 2

Arbeitsschema zur Präparation von Kollagen-Agarose



So wurde in der folgenden Reihe mit jeweils einem Liter Puffer gewaschen:

1. 0,1 mol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH = 7,8
2. 0,1 mol/l Tris - H_3PO_4 + 1 mol/l NaCl pH = 8,6
3. 0,1 mol/l Tris - H_3PO_4 + 1 mol/l NaCl pH = 4,1
4. 0,1 mol/l NaHCO_3 - 0,2 mol/l Glycin pH = 7,1
5. 0,05 mol/l Tris - HCl + 0,1 mol/l NaCl pH = 7,6

Puffer 2 und 3 wurden jeweils alternierend eingesetzt, um eine möglichst vollständige Entfernung des ungebundenen Kollagens zu erreichen.

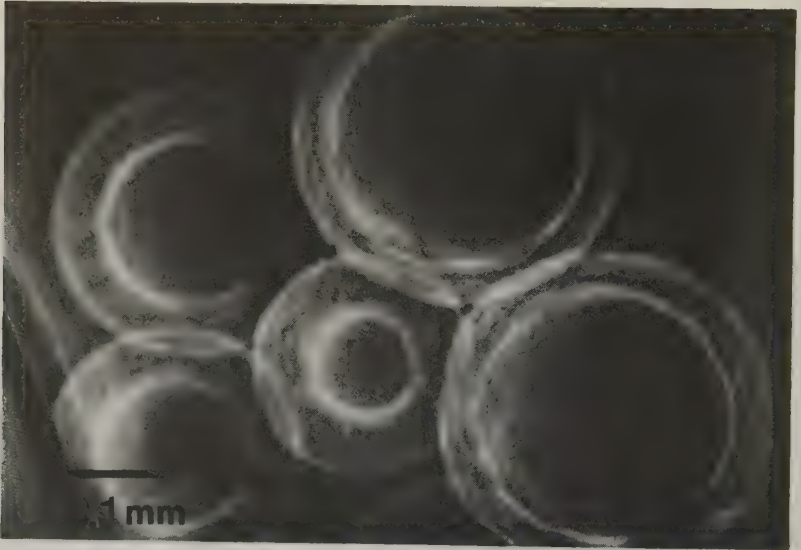
Im letzten Waschschrift wurde die suspendierte Kollagen-Agarose in einen Meßzylinder übergeführt und abermals sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Volumen des Kollagen-Agarose-Gels bestimmt.

In einem letzten Arbeitsschritt wurde das Kollagen-Agarose-Gel in MICHAELIS-Veronal-Puffer (pH = 7,6) resuspendiert, wobei wir ein Verhältnis von 5 - 6 ml Puffer auf ein Gramm Gel (Trockengewicht) zugrunde legten. Zusätzlich wurden 0,005 ml NaN_3 -Lösung (0,02 %) zugegeben, um Bakterienwachstum zu verhindern. Diese Kollagen-Agarose-Stammsuspension lagerten wir bei 4 °C. Das Ergebnis des Präparationsvorganges - vernetzte Kollagenfibrillen auf Agarosekugeln - zeigen Abb. 3 und 4.

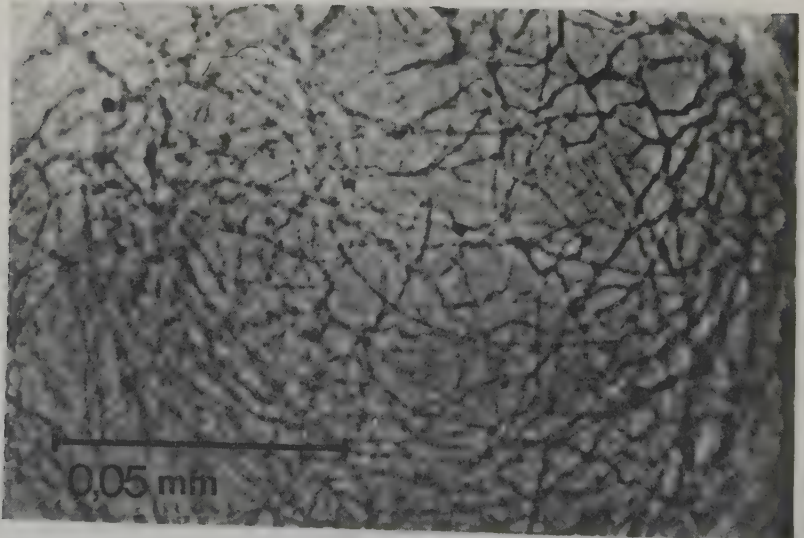
Durch weitere Verdünnung der Stammsuspension mit MICHAELIS-Veronal-Puffer, deren Ausmaß sich am Testeffekt orientierte, stellten wir die eigentliche Kollagen-Agarose-Arbeitssuspension her.

Abb. 3 - Vergrößerung ca. 450fach / Abb. 4 - Vergrößerung ca. 1100fach
Agarose-Kugeln mit vernetzten Kollagenfibrillen

3



4



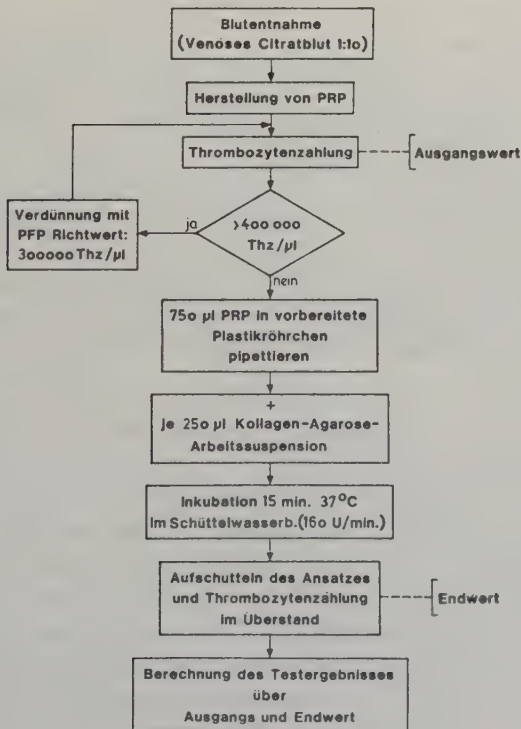
2. 6

Durchführung des Kollagen-Agarose-Testes

In Modifikation des von GROTHEMEYER vorgeschlagenen Verfahrens führten wir den Kollagen-Agarose-Test wie folgt durch (Abb. 5):

Abb. 5

Arbeitsschema zur Durchführung des Kollagen-Agarose-Testes



Nach Abnahme von venösem Citratblut wurde plättchenreiches Plasma hergestellt. Bei Thrombozytenzahlen über 400 000/ μ l PRP verdünnten wir auf etwa 300 000 Thz./ μ l PRP. Die ermittelte Thrombozytenzahl geht als "Ausgangswert" in die Berechnung des Testergebnisses ein.

In zwei vorbereitete Polystyrolröhrchen wurden dann jeweils 0,75 ml plättchenreiches Plasma pipettiert und mit jeweils 0,25 ml Kollagen-Agarose-Arbeitssuspension versetzt und unmittelbar anschließend 15 Minuten bei 37 °C und 160 U/min im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden die beiden Testansätze kurz aufgeschüttelt und die Thrombozytenzahl im Überstand ermittelt.

Aus diesem "Endwert" und dem "Ausgangswert" errechnete sich das Testergebnis folgendermaßen:

Die Thrombozytenausgangszahl wurde mit 0,75 multipliziert, um der Verdünnung durch die 0,25 ml Kollagen-Agarose-Arbeitssuspension Rechnung zu tragen.

Die Differenz des korrigierten Ausgangswertes und des Endwertes (Thrombozyten im Überstand) stellt die Anzahl absolut angelagerter Thrombozyten pro Mikroliter Testansatz dar. Den dimensionslosen Quotienten aus "Endwert" und korrigiertem "Ausgangswert", d. h. die Relativanlagerung, betrachten wir als Testergebnis.

2. 7

Immunfluoreszenzdarstellung von Thrombozyten

Mit den Thrombozyten einer gesunden, HLA-typisierten Probandin wurde ein Kollagen-Agarose-Test durchgeführt. Die beteiligten Komponenten untersuchten wir in der Methode der indirekten Immunfluoreszenz separat (PRP, Kollagen-Agarose-Arbeitssuspension) und nach Inkubation (Thrombozyten-Kollagen-Agarose-Komplex). Für diese Darstellungsweise war die Verfügbarkeit eines spezifischen Anti-HLA-Patientenserums Voraussetzung. Herrn Prof. Dr. W. Mempel sei an dieser Stelle für die Überlassung eines solchen Serums gedankt.

Wir gingen folgendermaßen vor (Abb. 6):

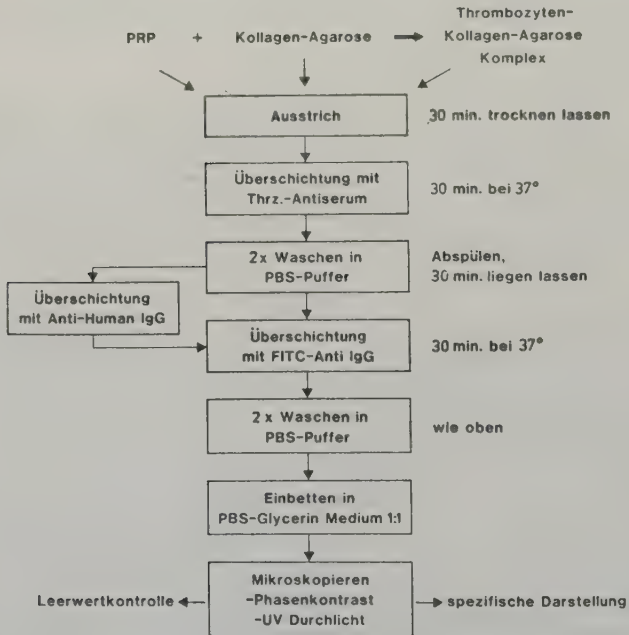
PRP, Kollagen-Agarose-Arbeitssuspension und Inkubationsgemisch (Thrombozyten-Kollagen-Agarose-Komplex) wurden jeweils auf einem Objektträger ausgestrichen und 30 Minuten getrocknet. Dann wurde mit spezifischem Anti-HLA-Patientenserum überschichtet und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer folgte eine Überschichtung mit FITC-Anti-IgG (Fa. Behring) für 30 Minuten bei 37 °C. Nach erneuter doppelter Waschung in PBS-Puffer wurde in PBS-Glycerin Medium (1:1) eingebettet.

Die Auswertung erfolgte mikroskopisch im Phasenkontrast und im UV-Durchlicht am Zeiss Axiomaten.

Eine Leerwertkontrolle zur Überprüfung der Antikörperspezifität des Anti-HLA-Patientenserums wurde in einem parallelen Arbeitsgang durchgeführt. Dabei wurden in einem PRP-Ausstrich nach Überschichtung mit Patientenserum die Anti-Antikörper-Bindungsstellen durch Zugabe von nicht markiertem Anti-IgG blockiert. Kriterium für Antikörperspezifität war fehlende Fluoreszenz bei weiterer Zugabe von markiertem Anti-IgG.

Abb. 6

Arbeitsschema zur Immunfluoreszenzdarstellung von Thrombozyten vor und nach Inkubation mit Kollagen-Agarose



2. 8

Untersuchte Kollektive

1. Gesunde Probanden:

Wir haben insgesamt 40 Probanden (Studenten, Klinikpersonal) im Alter von 20 bis 40 Jahren, die sicher keine Medikamente eingenommen hatten, zum Teil wiederholt Blut abgenommen.

Davon führten wir den Kollagen-Agarose-Test bei 26 Probanden für den Vergleich zwischen Heparin- und Citratwirkung separat durch. Für die Versuche 3.2.3, 3.2.6, 3.3.1 und 3.3.5 wurde der Test bei insgesamt fünf Probanden dieses Kollektivs ebenfalls jeweils separat durchgeführt.

Zum Aufbau und zur Kontrolle eines Referenzbereiches stellten wir gepooltes PRP her. Dabei verwendeten wir Thrombozyten von Spendern aus oben beschriebenem Personenkreis. In den jeweiligen Pool wurde eine gleich große Anzahl Plasmen von Männern und Frauen aufgenommen. Insbesondere bei der Haltbarkeitskontrolle von Kollagen-Agarose, wo wir gepooltes PRP wiederholt untersuchten, wurde darauf geachtet, daß möglichst dieselben Personen Thrombozyten spendeten. Die Zahl der jeweils gepoolten Einzelplasmen wird im folgenden mit "n = ..." angegeben.

2. Patienten:

Mit dem Kollagen-Agarose-Test untersuchten wir 45 Patienten der Medizinischen Klinik I unseres Hauses und der 3. Medizinischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses München-Schwabing unter der gezielten Fragestellung nach gesteigerter Thrombozytenfunktion.

Es ließen sich zwei Gruppen bilden:

- a) Patienten mit vaskulären Risikofaktoren, z. B.
 - Stoffwechselstörungen (Diabetes mellitus, Hyperlipidämie et al.)
 - Hypertonie
 - Raucher
 - Multifaktorielle Gefährdung (zwei oder mehr der genannten Risikofaktoren)

- b) Patienten mit Erkrankungen auf der Basis gesicherter makropathologischer Gefäßdefekte, z.B.
 - Koronare Herzkrankheit
 - Arterielle Verschußkrankheit
 - Cerebrovaskuläre Funktionsstörungen
 - Thrombangitis bzw. Thrombose

11 Patienten gehören beiden Gruppen an.

Die Typ I - Diabetiker bekamen bis auf Insulin keine Medikamente. Alle anderen Patienten wurden mit Arzneimitteln, darunter auch häufig mit Thrombozytenaggregationshemmern therapiert.

Zusätzlich wurden unselektiert 24 weitere Patienten aus dem Krankengut unserer Klinik untersucht, die sich nicht in diese Einteilung aufnehmen ließen. 23 davon berücksichtigten wir im Rahmen des Vergleiches des Kollagen-Agarose-Testes mit anderen Methoden zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion.

Einen weiteren Patienten beobachteten wir im Verlauf.

2. 9

Statistik

Zur statistischen Beschreibung unserer Ergebnisse verwendeten wir:

- Mittelwert $\bar{x}$
- Standardabweichung s
- Median x
- Dichtemittel D
- Spannweite R
- Variationskoeffizient $VK = \bar{x} / s (x 100 \%)$
- Regressionsanalyse:

Lineare Regression (X auf Y) mit Bildung der Regressionsgerade $y = A + BX$ und Berechnung des Korrelationskoeffizienten r sowie dem Standardfehler des Schlusses von X auf Y : $S_{y.x}$

Berechnung der verteilungsfreien Rangkorrelation nach SPEARMAN:

$$r^+ = 1 - \frac{6 \sum D^2}{n(n^2 - 1)}$$

D = Rangdifferenz eines Rangpaares

Zur statistischen Analyse unserer Ergebnisse verwendeten wir:

- DAVID-Test auf Normalverteilung.

Prüfgröße ist der Quotient R/s für den in Abhängigkeit der Irrtumswahrscheinlichkeit die kritischen Beurteilungsschranken tabelliert sind (84/S. 254).

- WILCOXON Paardifferenzen Test
- U-Test von WILCOXON, MANN und WHITNEY
- F-Test
- Vergleich eines empirischen Mittelwertes mit dem Mittelwert einer normalverteilten Grundgesamtheit mit der Entscheidungsgröße $t \frac{\bar{d}}{\sqrt{n}}$, wobei t für $n - 1$ Freiheitsgrade und die gewählte Irrtumswahrscheinlichkeit tabelliert ist (84/S. 201).

Die Prüfung auf Signifikanz führten wir unter zweiseitiger Fragestellung und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% (10% bei erwünschter Minimierung des statistischen Fehlers zweiter Art) durch.

3 ERGEBNISSE und DISKUSSION

3. 1 Untersuchungen zur Thrombozytenzählung im PRP (s. 2.3)

Vorversuch:

n = 20

Meßreihe (Methode) 1 - Thrombozytenzahl durch Auszählen der gesamten Neubauer-Kammer (entspricht 25 Gruppenquadranten).

Meßreihe (Methode) 2 - Thrombozytenzahl als Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung mit Auszählung von jeweils 10 Gruppenquadranten der Neubauer-Kammer.

Im WILCOXON-Paardifferenzentest bestand zwischen beiden Meßreihen kein Unterschied. Die Korrelationsanalyse zeigte gute Übereinstimmung beider Methoden. Die wesentlich aufwendigere Bestimmung der Thrombozytenzahl nach Methode 2 erschien uns daher entbehrlich.

Zur Untersuchung der im Weiteren verwendeten Bestimmungsmethode für die Thrombozytenzahl (2.3) wurden 159 Bestimmungen ausgewertet. Da die Thrombozytenzahl hierbei jeweils durch Mittelung zweier Zählwerte errechnet wurde, ist der Variationskoeffizient ein Maß der "Intra-Assay-Varianz" der jeweiligen Bestimmung.

Die Werte wurden von nur einem Untersucher erhoben, so daß in der folgenden Darstellung die "Intra-Assay-Varianz" unter definierten Bedingungen gezeigt wird (Abb.7/Tab.1).

Wir gliederten die Meßwerte in drei Zählbereiche auf:

Bereich 1 - Thrombozytenzahlen kleiner 100 000 / μ l

Bereich 2 - Thrombozytenzahlen zwischen 100 000 / μ l und
400 000 / μ l

Bereich 3 - Thrombozytenzahlen größer 400 000 / μ l

Da die Grenzen dieser Bereiche von uns willkürlich gesetzt wurden, sahen wir bei der statistischen Analyse der Variationskoeffizienten von einer Prüfung auf Signifikanz ab.

Im Mittel (Median) schwankte der Variationskoeffizient der Messungen zwischen 7% (7%) im unteren und 5% (5%) im oberen Zählbereich.

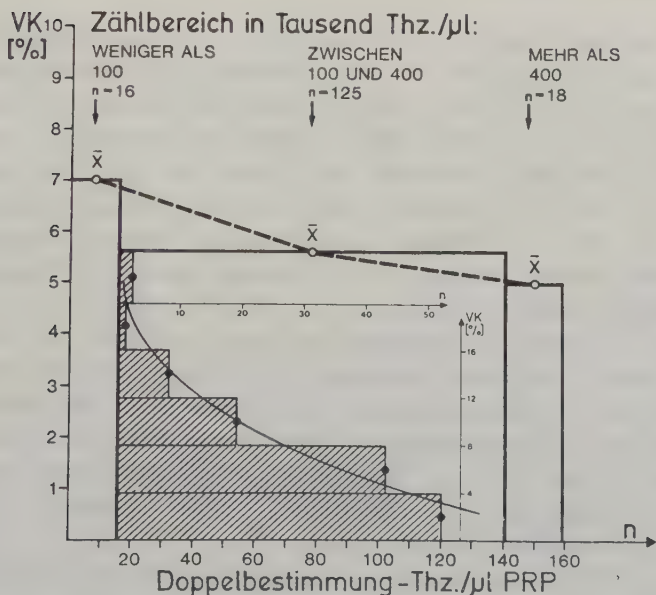
Die Betrachtung des mittleren Zählbereiches (100 000 - 400 000 Thz./ μ l PRP), in den die meisten Zählungen fallen, zeigt eine stark asymmetrische Verteilung der Variationskoeffizienten mit einem Dichtemittel von 3,4%. Die größte beobachtete Spannweite lag bei 22,1%.

In einer umfangreichen Analyse der manuellen Thrombozytenzählung wies WEISBERG (107) ebenfalls auf die zählbereichsabhängige Streuung des Variationskoeffizienten (in der Serie) zwischen 17% im unteren Zählbereich (40 000 - 74 000 Thz./ μ l Vollblut) und 5% im oberen Bereich (348 000 - 404 000 Thz./ μ l Vollblut) hin. Ohne zählbereichsabhängige Betrachtungsweise berichtete BUCHER (14) von einem mittleren Variationskoeffizienten

Abb. 7

Variation der manuellen Thrombozytenzählung.

Die Kästen kennzeichnen den Mittelwert aus n in diesem Zählbereich ermittelten Variationskoeffizienten aus Doppelbestimmungen. Im mittleren Kasten ist eine histogrammatische Häufigkeitsanalyse der hier erfaßten 125 Variationskoeffizienten aufgetragen.



(in der Serie) der Thrombozytenzählung aus Vollblut von 8,1%, der im Längsschnitt monatlich zwischen 2,4% und 16,8% schwankte.

Unsere geringere Streuung dürfte auf günstigere Arbeitsbedingungen zurückzuführen sein. So wurden unsere Thrombozytenzählungen aus gereinigten Plättchenanreicherungen mit industriell fertig konfektionierten Arbeitslösungen und vor allem von nur einem Untersucher erhoben. Fehler durch Ungenauigkeiten bei eigener Herstellung von Arbeitslösungen, vermehrte Irritationen des Untersuchers bei der mikroskopischen Thrombozytenzählung im Vollblut und durch Untersucherwechsel waren dadurch reduziert.

Die automatische Zellzählung führt bei Erleichterung der Durchführbarkeit zu einer Verbesserung der Reproduzierbarkeit (14, 45, 46). Dennoch stellen HÖFFLER und OETTE (45) im Rahmen ihres Vergleiches manueller und automatisierter Verfahren fest, daß die manuellen Methoden als Bezugsmethode nicht an Bedeutung verlieren werden. Denn es bestehen grundsätzlich Vorbehalte gegen automatisierte physikalische Zählverfahren (109) wegen problematischer Justierung des Zählbereiches ("Threshold"), fehlender Eichstandards und vor allem dem Fehlen einer adäquaten Richtigkeitskontrolle. Eine Verwendung des Coulter Counter zur Thrombozytenzählung in PRP bzw. mit Kollagen-Agarose inkubiertem PRP schien uns daher nicht ratsam, zumal einige orientierende Vergleichsmessungen unbefriedigende Übereinstimmung mit der Kammerzählung ergaben.

Die von uns verwendete Bestimmungsmethode der Thrombozytenzahl betrachten wir aus diesen Gründen und unter dem experimentell gezeigten Aspekt befriedigender Prä-

zision bei unserer Fragestellung als derzeit am besten operable Alternative. Ein weiterer Vorteil besteht dabei in der Möglichkeit des Untersuchers zur ständigen optischen Kontrolle durch das Mikroskop. Grobe Zählfehler z.B. durch Verunreinigungen der Zählproben mit Kollagen-Agarose-Partikeln sind so weitgehend ausgeschlossen.

Der Einsatz automatischer Zellzähler bleibt jedoch gerade auch unter wissenschaftlicher Fragestellung wünschenswert.

Tab. 1

Variationskoeffizienten der manuellen Thrombozytenzählung aus Doppelbestimmungen

a - im oberen Zählbereich (> 400 000 Thz./ μ l PRP)					
0.4 %	1.2 %	1.3 %	1.5 %	2.9 %	3.0 %
3.0 %	3.8 %	4.2 %	5.4 %	5.7 %	5.8 %
6.4 %	8.1 %	8.5 %	9.4 %	9.7 %	10.5 %
b - im mittleren Zählbereich (100 000 - 400 000 Thz./ μ l PRP)					
0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.2 %	0.4 %	0.5 %
0.5 %	0.5 %	0.7 %	0.9 %	0.9 %	0.9 %
1.0 %	1.1 %	1.2 %	1.3 %	1.3 %	1.5 %
1.7 %	1.7 %	1.8 %	1.8 %	1.9 %	1.9 %
2.0 %	2.0 %	2.0 %	2.0 %	2.1 %	2.3 %
2.3 %	2.4 %	2.5 %	2.6 %	2.6 %	2.7 %
2.7 %	2.8 %	2.9 %	2.9 %	3.0 %	3.1 %
3.1 %	3.1 %	3.2 %	3.3 %	3.3 %	3.4 %
3.4 %	3.5 %	3.6 %	3.9 %	4.1 %	4.1 %
4.2 %	4.2 %	4.3 %	4.5 %	4.6 %	4.6 %
4.7 %	4.8 %	5.0 %	5.1 %	5.3 %	5.3 %
5.6 %	5.7 %	5.8 %	5.9 %	5.9 %	5.9 %
5.9 %	6.0 %	6.1 %	6.2 %	6.2 %	6.2 %
6.4 %	6.5 %	6.7 %	6.7 %	6.7 %	6.7 %
6.8 %	6.9 %	7.1 %	7.2 %	7.3 %	7.3 %
7.4 %	7.5 %	7.5 %	7.7 %	7.8 %	8.0 %
8.0 %	8.1 %	8.2 %	8.3 %	8.4 %	8.5 %
8.5 %	8.7 %	9.2 %	9.4 %	9.6 %	9.7 %
9.7 %	10.1 %	10.3 %	11.0 %	11.5 %	11.8 %
12.8 %	13.0 %	13.2 %	13.2 %	13.7 %	13.7 %
15.3 %	15.4 %	16.4 %	20.2 %	22.1 %	
c - im unteren Zählbereich (< 100 000 Thz./ μ l PRP)					
0.0 %	1.5 %	1.6 %	1.8 %	2.2 %	2.2 %
3.5 %	6.3 %	8.1 %	8.2 %	9.3 %	10.2 %
10.4 %	13.9 %	15.4 %	17.9 %		

3. 2

Der Kollagen-Agarose-Test. Untersuchungen zum Testsystem

Blutplättchen werden durch Kontakt mit Kollagenfasern aktiviert. Dieser Mechanismus und seine Bedeutung für die Hämostase sind bisher noch weitgehend ungeklärt (8, 55, 86). Seine gute "in vitro" - Reproduzierbarkeit ist Grundlage unterschiedlicher Testverfahren für die Thrombozytenadhäsion bzw.-aggregation. Die Verwendung des Kollagens ist dabei höchst unterschiedlich, beispielsweise als Suspension von Kollagenfasern oder in Form Kollagen überzogener Oberflächen.

Nach dem Vorschlag von HEENE und MATHIAS (41) Strukturproteine mit CNBr-aktivierter Sepharose zu insolubilisieren und dann säulenchromatographisch zu verwenden, beschrieb GROTHEMEYER (36) 1976 an Agarose gekoppeltes Kollagen als neues Reagens zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion. Die an Agarose gebundenen Kollagenfasern führen zu einer initialen Thrombozytenaktivierung und -anlagerung ohne Aggregation. Inkubiert man PRP und Kollagen-Agarose, ist die Differenz der Thrombozytenzahlen vor und nach Inkubation daher ein Maß für die Adhäsion. Auf diesen Grundlagen ließ sich ein Test entwickeln, der seither in der Neurologischen Klinik der Universität Essen durchgeführt wird (52). Wir untersuchten den Kollagen-Agarose-Test unter den in der Einleitung skizzierten Aspekten.

Voraussetzung für die Durchführbarkeit dieser Methode war die Präparation insolubilisierten Kollagens. Dies war aufwendig und zeitintensiv, konnte aber mehrfach in unserem Laboratorium problemlos bewältigt werden.

Eine biochemische Kontrolle der Präparation war im Rah-

men dieser Arbeit nicht möglich. Über die Aktivität der jeweiligen Charge orientierten wir uns durch Untersuchung von PRP gesunder Probanden. Standardisierung und Qualitätskontrolle des Präparationsvorganges mußten daher unbefriedigend bleiben.

Unsere Chargen untersuchten wir mikroskopisch auf überschüssiges Kollagen und möglichst gleichmäßige Vernetzung der Agarose mit den Fibrillen. Bakteriologisch erfolgte eine Kontrolle auf Bakterienwachstum.

In der von uns vorgestellten Form (2.6) zeichnete sich der Kollagen-Agarose-Test im Vergleich zu bisher durchgeführten Thrombozytenfunktionsuntersuchungen durch eine sehr gute Durchführbarkeit aus:

Die geringe Testdauer und die teilweise mögliche gleichzeitige Erledigung der beteiligten Arbeitsschritte

- Thrombozytenpräparation ca. 30 min.
- drei - vierfache Bestimmung von Thrombozytenzahlen, ca. 45 - 60 min.
- eigentliche Testdurchführung, ca. 15 min.

ermöglichen einen Probendurchsatz von bis zu fünf Testansätzen pro Tag und Assistentin in der für Thrombozytenuntersuchungen empfohlenen Verarbeitungszeit von drei Stunden.

Der verhältnismäßig geringe Verbrauch von Untersuchungsmaterial erleichtert die Durchführung dieser Untersuchung aus der für Gerinnungsuntersuchungen üblichen Citratblutmenge. Da pro Testansatz nur wenig Kollagen-Agarose verbraucht wird, ist eine hohe Ausnutzung der präparierten Stammsuspension gegeben. Hierdurch ist der Aufwand bei der Herstellung von Kollagen-Agarose nur selten nötig und daher auch für ein Routinelabor vertretbar.

3. 2. 1

Abhängigkeit der Thrombozytenanlagerung im Kollagen-Agarose-Test von der Thrombozytenausgangszahl

Zweimal wurde aus plättchenreichem Plasma gesunder Probanden ein PRP-Pool hergestellt ($n = 6$, $n = 10$) und mit ebenfalls gepooltem plättchenfreiem Plasma derselben Probanden auf Thrombozytenzahlen zwischen ca. 50 000 und 400 000 / μ l PRP eingestellt (Pool 1 / Pool 2 : 65,5/48,5 - 78/97 - 148,5/149,5 - 221,5/210 - 307,5/326 - 422/421 jeweils $\times 10^3$ Thz./ μ l PRP).

Der Test wurde mit dem ersten Pool ($n = 6$) mit Kollagen-Agarose in der Verdünnung der Stammsuspension 1:2, mit dem zweiten Pool ($n = 10$) in der Verdünnung der Stammsuspension 1:4 durchgeführt. In beiden Versuchen wurde von der PRP-Verdünnung mit ca. 300 000 Thz./ μ l eine Mehrfachbestimmung durchgeführt (Abb. 8 / Tab. 2).

Die absolute Anlagerung läßt sich in beiden Versuchen am besten mit einem exponentiellen Graphen darstellen. Statistisch belegt dies der Korrelationskoeffizient aus der Analyse der halblogarithmischen Darstellung:

- Verdünnungsstufe 1:2 : $r = 0,9797$	$r^+ = 0,7920$
- Verdünnungsstufe 1:4 : $r = 0,9584$	$r^+ = 0,8536$

Die Rangkorrelationen (r^+) sind nach SPEARMAN hochsignifikant von Null unterschieden ($p < 0,001$).

Die relative Anlagerung ergibt mit der Thrombozytenausgangszahl folgende Korrelationskoeffizienten:

- Verdünnungsstufe 1:2 : $r = 0,9632$	$r^+ = 0,8681$
- Verdünnungsstufe 1:4 : $r = 0,9458$	$r^+ = 0,8536$

Nach SPEARMAN entspricht dies ebenfalls einer hochsignifikanten Korrelation ($p < 0,001$). Ein positiver, linearer Zusammenhang zwischen Thrombozytenausgangszahl und relativer Anlagerung ist damit statistisch hinreichend belegt (Abb. 9).

Diesen Zusammenhang halten wir für ein wesentliches Ergebnis, das sich aus beiden unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen gleichermaßen ergab, d.h. reproduzierbar war.

Wir interpretieren diesen Zusammenhang so, daß Kollagen-Agarose die Blutplättchen aktiviert und sich je nach Thrombozytenausgangszahl lawinenartig eine immer höhere Zahl anlagert.

Abb. 8

Absolute Thrombozytenanlagerung bei verschiedenen Verdünnungsstufen der Stammsuspension in Abhängigkeit von der Thrombozytenausgangszahl

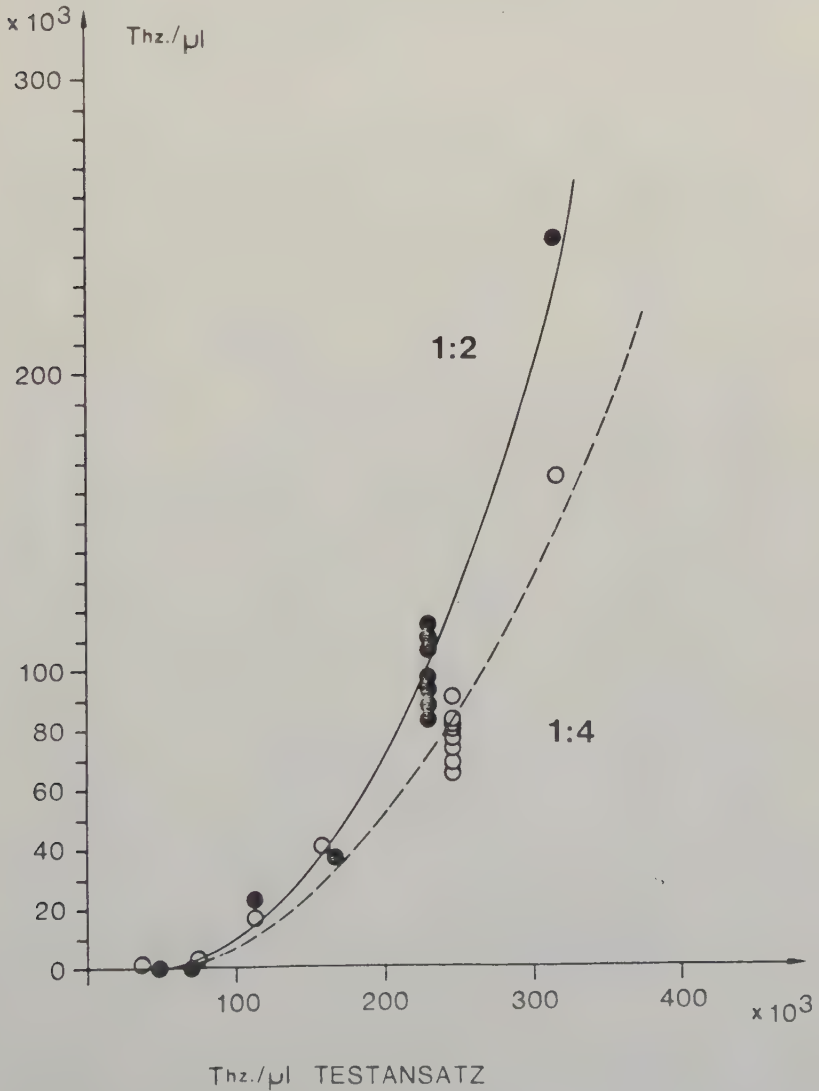
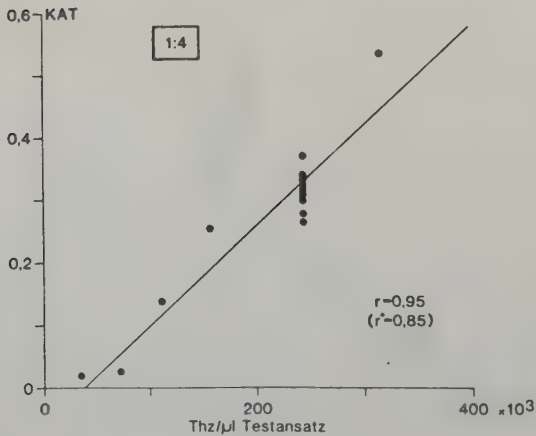
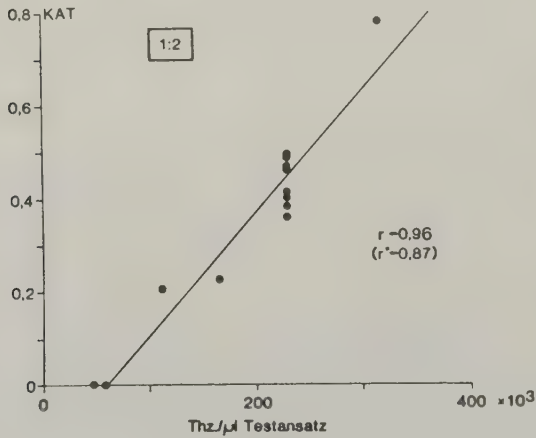


Abb. 9

Relative Thrombozytenanlagerung bei verschiedenen Verdünnungsstufen der Stammsuspension in Abhängigkeit von der Thrombozytenausgangszahl



Tab. 2

Abhängigkeit der Thrombozytenanlagerung im Kollagen-Agarose-Test von der Thrombozytenausgangszahl

a) Arbeitssuspension-Verdünnung der Stammsuspension:

1 : 2

PRP	Thz. i. Testansatz	Anlagerung	
		absolut	relativ
$\times 10^3$ Thz./ μ l	$\times 10^3$ Thz./ μ l	$\times 10^3$ Thz./ μ l	
65,5	49	0	0
78	58,5	0	0
148,5	111,5	23	0,206
221,5	166	37,5	0,226
307,5	230,5	83	0,360
307,5	230,5	95,5	0,414
307,5	230,5	88	0,382
307,5	230,5	108	0,469
307,5	230,5	108	0,469
307,5	230,5	92,5	0,401
307,5	230,5	114	0,495
307,5	230,5	106	0,460
307,5	230,5	112,5	0,488
422	316,5	246,5	0,779

Tab. 2

Abhängigkeit der Thrombozytenanlagerung im Kollagen-Agarose-Test von der Thrombozytenausgangszahl

b) Arbeitssuspension-Verdünnung der Stammsuspension:

1 : 4

PRP	Thz. i. Testansatz	Anlagerung	
		absolut	relativ
$\times 10^3$ Thz./ μ l	$\times 10^3$ Thz./ μ l	$\times 10^3$ Thz./ μ l	
48,5	36,5	1	0,021
97	73	2	0,027
149,5	112	15,5	0,138
210	157,5	40	0,254
326	244,5	79	0,323
326	244,5	90	0,368
326	244,5	75	0,307
326	244,5	67,5	0,276
326	244,5	80,5	0,329
326	244,5	64,5	0,264
326	244,5	82	0,335
326	244,5	90	0,368
326	244,5	73	0,299
326	244,5	77	0,315
421	316	168,5	0,533

GROTHEMEYER (36) schilderte eine ähnliche Beziehung zwischen Thrombozytenausgangszahl und Testeffekt.

Gut in Einklang zu bringen hiermit sind Befunde von LEYTIN (59) zur Dynamik der Thrombozytenaktivierung. Danach führt die Adhäsion von Thrombozyten an Kollagen zu einer neuen, veränderten Aktivität der mit Thrombozyten belegten Kollagenfasern ("Thrombogenicity"), die zu einer massiven weiteren Einbeziehung und Aggregation noch nicht aktivierter Blutplättchen führt. Die von LEYTIN dafür veranschlagte Zeit entspricht etwa unserer Inkubationszeit, so daß dieser Effekt zur Erklärung unserer Ergebnisse in Betracht kommen könnte.

3. 2. 1. 1

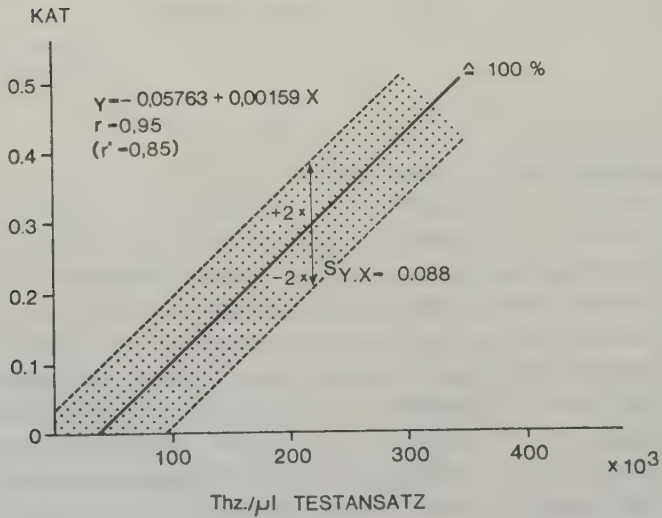
Bezugskurve und Referenzbereich

Die normierte Beurteilung der Thrombozytenfunktion im Kollagen-Agarose-Test erfordert einen Referenzbereich mit klaren Entscheidungsgrenzen. Wir definierten ihn auf der Grundlage des Zusammenhanges zwischen Thrombozytenanlagerung und -ausgangszahl. Dabei verwendeten wir für eine Kollagen-Agarose-Charge, deren Stammsuspension 1 : 4 verdünnt wurde, die Regressionsgerade zwischen relativer Anlagerung und Thrombozytenausgangszahl als Bezugskurve. Voraussetzung für die Gültigkeit waren standardisierte Arbeitsbedingungen (2.6), vor allem aber die Verwendung derselben Kollagen-Agarose-Präparation in gleicher Verdünnung (Abb. 10).

Mit dem Fehler der Schätzung von X auf Y ($S_{y.x}$) ist die Definition eines Bereiches um die Regressionsgerade möglich, der von jeweils einer Parallelen im Abstand

Abb. 10

Bezugskurve (Regressionsgerade) für Kollagen-Agarose-Arbeitssuspension in der Verdünnungsstufe "1 : 4" der Stammsuspension



" $2 \times S_{y.x}$ " nach oben und unten markiert wird und 95% aller aus dem Beobachtungskollektiv stammenden Werte enthält. Dieser Bereich ist deutlich weiter gefaßt als der 95%-Vertrauensbereich der Regressionsgerade. Der üblicherweise großen Breite des Normalbereichs zellulärer Funktionen entsprechend, betrachten wir ihn als einen sinnvollen, gut verwendbaren Referenzbereich.

Setzt man den aus der Bezugskurve errechneten Erwartungswert gleich 100% und gibt " $2 \times S_{y.x}$ " in Prozent des Erwartungswertes an, verlaufen die Grenzen des Referenzbereiches für hyper- und hyporeagible Funktionszustände hyperbolisch und nähern sich asymptotisch der X-Achse (Abb. 11).

Diese Transformation schien uns sinnvoll, um die unterschiedliche Wertigkeit der konstanten Größe " $2 \times S_{y.x}$ " gegenüber dem Erwartungswert zu berücksichtigen.

Im Bereich hoher Thrombozytenausgangszahlen ist die Trennschärfe des Testsystems am größten. Wir hielten es dennoch für wichtiger, den Test bei niedrigeren Thrombozytenzahlen durchzuführen, da nicht für alle plättchenreichen Plasmen hohe Thrombozytenzahlen erreichbar waren. Die Beurteilung der Untersuchungsergebnisse konnte so wesentlich vereinheitlicht werden. Im Regelfall, d.h. im Bereich von 225 000 Thz./ μ l Testansatz (das entspricht 300 000 Thz./ μ l PRP) liegt der Referenzbereich etwa zwischen 70% und 130%.

Mit diesem Beurteilungsmodus läßt sich zu jeder Thrombozytenausgangszahl ein Erwartungswert mit zugehörigen Beurteilungsgrenzen errechnen. Dies gibt uns die Möglichkeit alle mit derselben Kollagen-Agarose-Charge in gleicher Verdünnung ermittelten Untersuchungsergebnisse in Prozent des Erwartungswertes anzugeben und ihre Zugehörigkeit zum Referenzbereich zu beurteilen. Wo dies

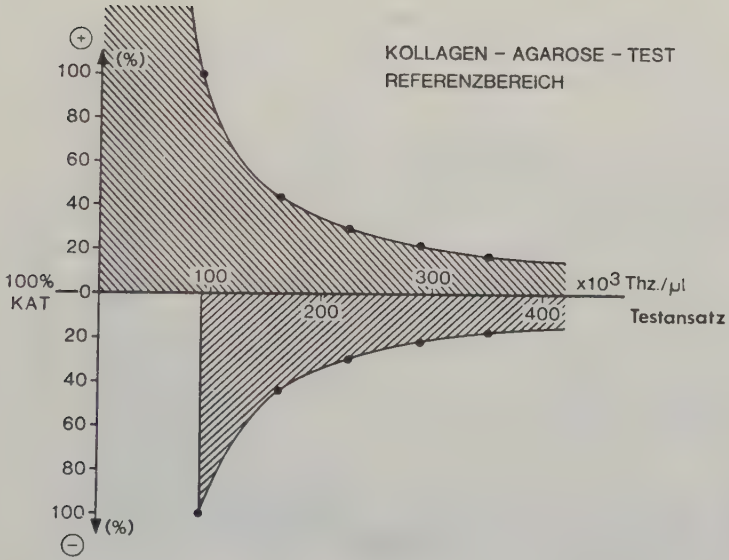
im Folgenden möglich war, haben wir diese normierte Darstellungsform gewählt.

Da die verhältnismäßig kleine Fallzahl in diesen Versuchen Aussagen über die Stichprobenverteilung nur mit statistischer Unschärfe zuläßt, sollte dieser Beurteilungsmodus lediglich als Interpretationshilfe für folgende Abschnitte verstanden werden.

Die Präparation einer neuen Charge Kollagen-Agarose macht es notwendig, den Referenzbereich in der geschilderten Weise jeweils neu zu definieren. In der Durchführung des erforderlichen Versuches (3.2.1) hat es sich dabei als außerordentlich praktikabel erwiesen, gepoolte Normalplasmen zu verwenden (1), da hierdurch der Aufwand beträchtlich verringert werden konnte. Trotz der außerordentlich aufwendigen Anordnung dieses Versuches konnte so die für Thrombozytenuntersuchungen empfohlene Richtzeit von drei Stunden eingehalten werden.

Abb. 11

Normierter Referenzbereich für den Kollagen-Agarose-Test



3. 2. 2

Streubreite des Kollagen-Agarose-Testes

In Analogie zu den Untersuchungen im Abschnitt 3.1 wurde die methodische Variationsbreite des gesamten Testsystems untersucht:

1. Intra-Assay-Präzision aus Mehrfachbestimmungen.

Gepooltes Normal-PRP, eingestellt auf ca. 300 000 Thz./ μ l wurde mit Kollagen-Agarose zweimal, nämlich in den Verdünnungsstufen der Stammsuspension "1 : 2" und "1 : 4" neunfach bzw. zehnfach untersucht. Aus der Neunfachbestimmung ergab sich ein Variationskoeffizient von 11,2%, aus der Zehnfachbestimmung von 10,7%.

2. Intra-Assay-Präzision aus Doppelbestimmungen.

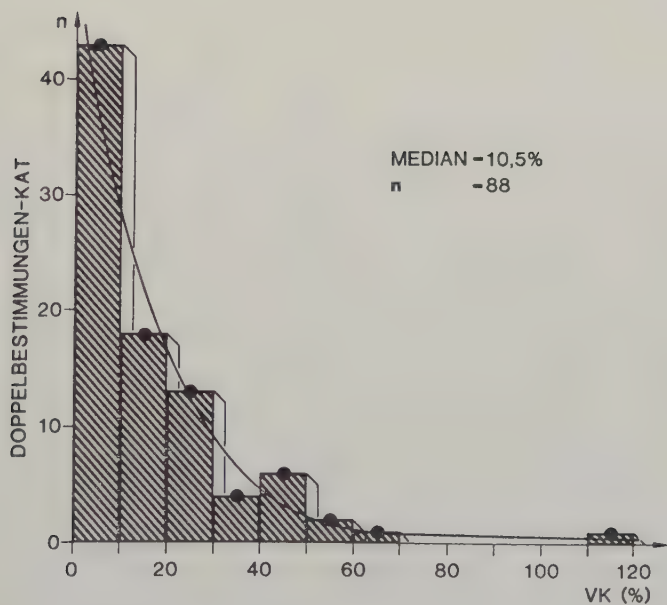
Wir werteten die Variationskoeffizienten aus 88 Doppelbestimmungen, die von 57 Probanden im Rahmen unserer Patientenstudien durchgeführt wurden, aus (Tab. 3). Im Mittel beträgt der Variationskoeffizient 16,7%. Da jedoch offensichtlich keine Normalverteilung der Einzelwerte vorliegt, sind Median (10,5%) und Dichtemittel (6,3%) aussagekräftiger. Die histogrammische Verteilungsanalyse zeigt Abb. 12.

Nach klinisch-chemischen Maßstäben ist diese methodische Streuung verhältnismäßig groß. Von ihr erfaßt sind alle bei der Testdurchführung beteiligten Arbeitsschritte. Wesentlichen Anteil hat dabei sicherlich die für jeden Testansatz mehrfach notwendige Thrombozytenzählung mit einer mittleren Streuung von 7% (3.1).

Entscheidend ist die Variation der Methode beim Aufbau des Referenzbereiches aus einer experimentell ermittel-

Abb. 12

Histographische Verteilungsanalyse der Variationskoeffizienten aus doppelt durchgeführten Kollagen-Agarose-Untersuchungen



ten Bezugskurve (3.2.1.1.) und der darauf gründenden Beurteilung von Untersuchungsergebnissen. Der von uns gewählte Referenzbereich trägt diesen Überlegungen hinreichend Rechnung. Berücksichtigt man in der Beurteilung der Untersuchungsergebnisse auch die bei Zellfunktionsuntersuchungen geltenden weitgefaßten Normalbereiche, ist die Präzision dieser Untersuchungsmethode ausreichend (16, 40).

Dem Vorschlag von BÜTTNER (15), eine methodische Streuung von einem Viertel des "Normalbereiches" des beobachteten Meßparameters zu akzeptieren, können wir voll entsprechen.

Tab. 3

88 Variationskoeffizienten aus jeweils doppelt durchgeführten Kollagen-Agarose-Untersuchungen

0.0 %	0.0 %	0.0 %	1.0 %	1.0 %	1.0 %
2.0 %	2.0 %	2.0 %	2.0 %	3.0 %	3.0 %
3.0 %	3.0 %	3.0 %	3.0 %	3.0 %	4.0 %
4.0 %	4.0 %	4.0 %	5.0 %	5.0 %	5.0 %
5.0 %	5.0 %	5.0 %	6.0 %	6.0 %	6.0 %
6.0 %	7.0 %	7.0 %	7.0 %	7.0 %	8.0 %
9.0 %	9.0 %	9.0 %	9.0 %	9.0 %	9.0 %
9.0 %	10.0 %	11.0 %	11.0 %	11.0 %	12.0 %
12.0 %	12.0 %	13.0 %	13.0 %	14.0 %	15.0 %
16.0 %	17.0 %	17.0 %	17.0 %	18.0 %	19.0 %
19.0 %	21.0 %	22.0 %	22.0 %	22.0 %	23.0 %
25.0 %	25.0 %	25.0 %	26.0 %	27.0 %	28.0 %
29.0 %	29.0 %	31.0 %	31.0 %	32.0 %	35.0 %
40.0 %	41.0 %	43.0 %	46.0 %	47.0 %	48.0 %
55.0 %	58.0 %	65.0 %	119.0 %		

3. 2. 3

Einfluß der Kollagen-Agarose-Konzentration im Testansatz auf das Untersuchungsergebnis

Zur Leerwertkontrolle des Kollagen-Agarose-Testes führten wir die Untersuchung mit PRP einer gesunden weiblichen Probandin unter gleichen Meßbedingungen mit kollagenfreien Reagentien durch. Hierzu verwendeten wir Veronal-Puffer bzw. Sepharose 4B (CNBr-aktiviert) - Suspension, deren Konzentration der Kollagen-Agarose-Arbeitssuspension durch Rückrechnung aus den Präparationsverhältnissen angeglichen wurde.

Für den Leeransatz mit Veronal-Puffer fanden wir aus vierfacher Bestimmung ein Ergebnis, das im Rahmen des methodischen Fehlers (3.2.2) mit dem stöchiometrischen Verdünnungseffekt übereinstimmt. Eine in gleicher Weise durchgeführte Fünffachbestimmung mit der Sepharose 4B-Suspension zeigt das gleiche Ergebnis (Tab. 4).

Damit ist der Nachweis erbracht, daß die in der Kollagen-Agarose Arbeitssuspension enthaltenen Einzelkomponenten (CNBr-aktivierte Sepharose 4B und Veronal-Puffer) ohne Kollagen keine Thrombozytenadhäsion bewirken.

Die Konzentration von Kollagen-Agarose hatte einen deutlichen Einfluß auf das Ausmaß der Thrombozytenanlagerung. Mit geringer werdenden Kollagen-Agarose Konzentrationen im Testansatz nahm die Anzahl sowohl absolut als auch relativ angelagerter Thrombozyten deutlich ab. Die Inkubation von PRP eines gesunden männlichen Probanden mit Kollagen-Agarose in unterschiedlichen Verdünnungsstufen der Stammsuspension zeigte folgendes Ergebnis (Abb. 13 / Tab. 5):

Tab. 4

Leerwertkontrollversuch mit Veronal-Puffer und Sepharose 4B (CNBr-aktiviert) - Suspension

nach Inkubation mit Veronal-Puffer	Thz. i. Überstand	nach Inkubation mit Sepharose 4B-Suspension
Thz./ μ l		Thz./ μ l
265 000		293 500
301 000		300 000
305 000		287 500
312 500		287 500
		293 500
$\bar{x} = 296\ 000$		$\bar{x} = 292\ 500$

Aus der Verdünnung errechneter Erwartungswert:
285 000 Thz./ μ l

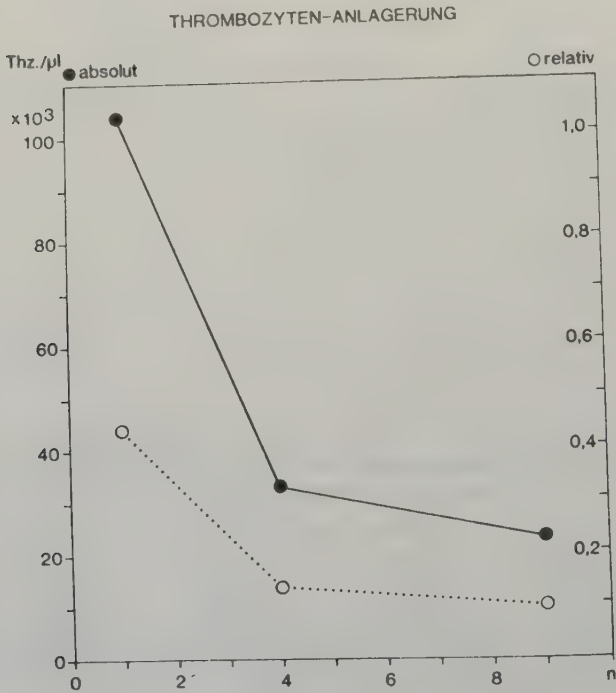
Tab. 5

Einfluß der Kollagen-Agarose-Konzentration auf das Test-
ergebnis

Arbeitssusp. Verdünnung	Thz. i. Überstand	Anlagerung	
		absolut	relativ
	Thz./ μ l	Thz./ μ l	
1 : 2	134 500	104 000	0,436
1 : 5	205 500	33 000	0,138
1 : 10	215 500	23 000	0,096
Ausgangswert: 238 500 Thz./ μ l Testansatz vor Inkubation			

Abb. 13

Einfluß der Kollagen-Agarose-Konzentration auf die absolute und relative Thrombozytenanlagerung im Testansatz



Verdünnung d. Stammsuspension mit n-Teilen Veronal-Puffer
im Verhältnis: $1+n \hat{=} 1:(n+1)$

Aus den vorliegenden Ergebnissen können wir diesen Zusammenhang mathematisch nicht näher charakterisieren. Offensichtlich beeinflussen Kollagen-Agarose-Konzentration und Thrombozytenausgangszahl das Untersuchungsergebnis gleichsinnig.

Wir vermuten, daß für die Thrombozytenanlagerung das Verhältnis von Kollagen-Agarose zur Thrombozytenausgangszahl entscheidend ist. Dabei würden geringe Kollagen-Agarose-Konzentrationen nur eine bestimmte Zahl der im Testansatz vorhandenen Thrombozyten aktivieren. Ist der Kollagen-Agarose Stimulus übermaximal, müßten nahezu alle Thrombozyten adhärieren.

3. 2. 4

Einfluß der Standzeit nach Blutentnahme auf das Testergebnis

PRP gesunder Probanden ($n = 8$) wurde gepoolt und mit Kollagen-Agarose-Arbeitssuspension (Verdünnungsstufe 1:4) unter Standardbedingungen (2.6) zu verschiedenen Zeitpunkten (ca. 105/165/225/285 min) nach der Blutentnahme untersucht. Dabei sind diese Zeitpunkte nur ungefähr anzugeben, da den einzelnen Probanden hintereinander Blut abgenommen wurde und daher ein gewisser Zeitfehler entsteht.

Es zeigte sich initial ein gleichbleibender, nach etwa fünf Stunden gesteigerter, die methodische Streuung (3.2.2) übertreffender Testeffekt (Abb. 14/Tab. 6).

3. 2. 5

Einfluß der Inkubationsbedingungen auf das Testergebnis

Wir wiederholten die Versuchsanordnung in 3.2.4 mit demselben Plasmapool unter veränderten Inkubationsbedingungen. Dabei wurde der Testansatz jeweils bei 20 °C Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler inkubiert.

Das Untersuchungsergebnis lag insgesamt weit höher und verringerte sich zeitabhängig in exponentieller Form (Abb. 14/Tab. 6).

Die vermutlich stärkere mechanische Durchmischung des Testansatzes bei diesem Inkubationsmodus scheint die wesentlich höheren Thrombozytenanlagerungen zu verursachen. Das zeitabhängige Abnehmen der Thrombozytenanlagerung demonstriert die geringere Reproduzierbarkeit des Testergebnisses unter diesen Bedingungen.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus 3.2.4 halten wir es daher für sinnvoll, den Test bei 37 °C und im Schüttelwasserbad wegen der geringeren Zeitabhängigkeit durchzuführen.

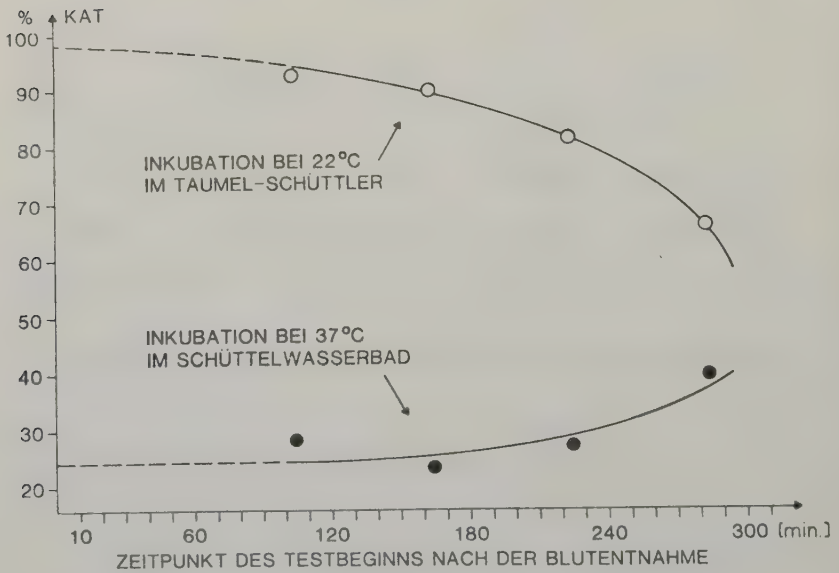
Tab. 6

Abhängigkeit des Kollagen-Agarose-Testergebnisses von der Zeit nach Blutentnahme und den Inkubationsbedingungen

nach Inkubation im/am				
Schüttelwasserbad (37 °C)			Taumelschüttler (20 °C)	
Zeit nach Blutentnahme	Thz. i. Überst.	Relativ-Anlagerung	Thz. i. Überst.	Relativ-Anlagerung
min	Thz./ μ l		Thz./ μ l	
ca. 105	154 000	0,280	16 000	0,925
ca. 165	164 000	0,234	23 000	0,893
ca. 225	156 000	0,271	41 000	0,810
ca. 285	130 000	0,393	74 500	0,652
Ausgangswert: 214 000 Thz./ μ l Testansatz vor Inkubation				

Abb. 14

Abhängigkeit des Kollagen-Agarose-Testergebnisses von der Zeit nach Blutentnahme und den Inkubationsbedingungen



3. 2. 6

Einfluß der Standzeit des Testansatzes nach Inkubation auf das Testergebnis

Untersuchungsobjekt im Kollagen-Agarose-Test sind im Plasma suspendierte Thrombozyten. Die entscheidende Voraussetzung für die Gültigkeit des Testergebnisses ist die Homogenität der Thrombozytenkonzentration im Testansatz. Es sollte geprüft werden, ob eine zeitabhängige Sedimentation der Thrombozyten im Testansatz nach Inkubation auftritt und das Untersuchungsergebnis verfälschen kann.

Hierzu wurde die Thrombozytenzahl nach Inkubation unter Standardbedingungen (2.6) bei gleichzeitiger Registrierung der Standzeit wiederholt bestimmt (Abb. 15/Tab. 7).

Der Zusammenhang zwischen Standzeit und Zählwert ($r^+ = 0,7143$) ist nach SPEARMAN nicht signifikant von Null unterschieden. Auch die sich daraus ergebenden Untersuchungsergebnisse sind mit der Standzeit nicht signifikant korreliert.

Bei prompter Weiterverarbeitung der Meßprobe nach Durchführung des Testes halten wir den Sedimentationseffekt und seine Auswirkungen auf das Testergebnis für vernachlässigbar.

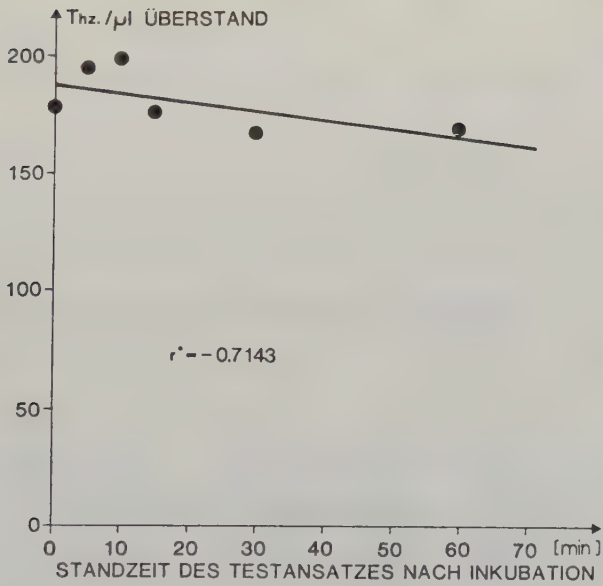
Tab. 7

Sedimentationseffekt von Thrombozyten im Testansatz nach Inkubation

Zeit nach Inkubation	Thz. i. Überstand	Relativ- Anlagerung
min	Thz./ μ l	
0	178 000	0,282
5	195 000	0,214
10	199 000	0,198
15	176 000	0,290
30	167 000	0,327
60	169 000	0,319
Ausgangswert: 248 000 Thz./ μ l Testansatz vor Inkubation		

Abb. 15

Thrombozyten im Testansatz nach Inkubation



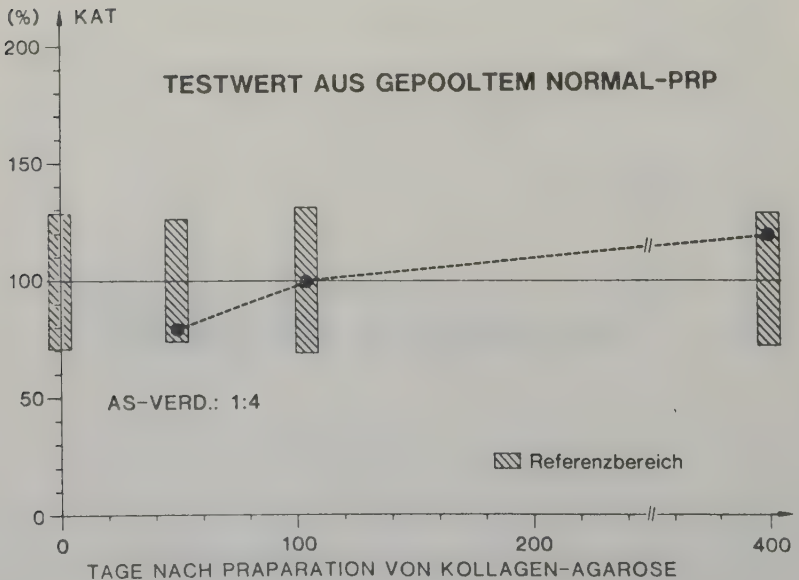
3. 2. 7

Halbbarkeitskontrolle einer Kollagen-Agarose-Präparation

In verschiedenen zeitlichen Abständen (nach 52, 107 und 400 Tagen) nach Präparation von Kollagen-Agarose wurde dreimal plättchenreiches Plasma gesunder Probanden ($n = 6$, $n = 8$, $n = 8$) gepoolt und im Kollagen-Agarose-Test untersucht. Die normierten Ergebnisse und die zugehörigen Grenzen des Referenzbereiches zeigen Abb. 16 und Tab. 8.

Abb. 16

Halbbarkeitskontrolle von Kollagen-Agarose (normierte Darstellung)



Tab. 8

Haltbarkeitskontrolle von Kollagen-Agarose

Pool-Nr.	Tage nach Präparation	KAT	Grenzen des Referenzbereiches	
			untere	obere
		%	%	%
3	52	80	74	126
4	107	99	69	131
5	400	118	72	128

In allen drei Fällen lag das Untersuchungsergebnis in den vorgegebenen Grenzen des Referenzbereiches. Bei gleichen Lagerungs- und Meßbedingungen scheint über den Zeitraum von 400 Tagen keine wesentliche Änderung der Eigenschaften der Kollagen-Agarose eingetreten zu sein, wenn man den Testeffekt als hinreichend geeignetes Beurteilungskriterium hierfür betrachtet.

Wir halten die Kollagen-Agarose-Präparation daher für ausreichend stabil. Vor allem die Tatsache, daß Kollagen-Agarose selbst nach 400 Tagen Lagerung bei 4 °C gut aktiv war und der mit Gesunden erhaltene Testwert im Referenzbereich lag, rechtfertigt die Durchführung dieser Untersuchung auch mit langfristig gelagerten Kollagen-Agarose-Präparationen.

3. 3

Studien mit dem Testsystem zum "in vitro" - Verhalten der Thrombozyten

3. 3. 1

pH-Wert Registrierung

pH-Wert Änderungen in einer Plasmasuspension von Thrombozyten können als Ergebnis metabolischer Prozesse der Blutplättchen betrachtet werden. Inwieweit Kollagen-Agarose solche Prozesse induziert, versuchten wir daher durch die Messung der Wasserstoffionenkonzentration nach Blutentnahme, nach Präparation von PRP sowie vor und nach Testdurchführung zu ermitteln. In dieser Weise untersucht wurde jeweils ein gesunder weiblicher und männlicher Proband (Tab. 9).

Bekannt waren die pH-Werte der zu pipettierten Reagentien (Natriumcitrat zur Blutentnahme pH = 7,5 / Veronalpuffer nach MICHAELIS pH = 7,6 / Kollagen-Agarose-Arbeitssuspension pH = 7,6) sowie die venösen Vollblut-pH-Werte (jeweils 7,4).

Nach Präparation von plättchenreichem Plasma zeigte sich ein zeitabhängiges Ansteigen des pH-Wertes auf 7,8 nach ca. zwei Stunden. Zupipettieren von Kollagen-Agarose-Arbeitssuspension führte zu einem initialen Stagnieren bzw. Sinken des pH-Wertes um 0,1, gefolgt von einem steilen weiteren Anstieg während der Inkubation auf 8,0. Nach Inkubation pendelte sich der pH-Wert bei 8,0 ein und blieb weitgehend stabil. Ein mitgeführter Leeransatz (statt Arbeitssuspension Veronalpuffer zupipettiert) zeigte geringfügig alkalischere pH-Werte (8,1).

Der geschilderte Verlauf des pH-Wertes war in beiden Versuchsansätzen ähnlich.

Der pH-Wert von Plättchensuspensionen wird nicht nur durch deren Metabolismus beeinflusst, sondern hat seinerseits Auswirkungen auf die Thrombozytenfunktion.

Tab. 9

Wasserstoffionenkonzentration im PRP vor, während und nach Inkubation mit Kollagen-Agarose-Arbeitssuspension

Zeit nach Blutabn.	pH-Werte im			
	PRP ♀		PRP ♂	
45 min	7,6		7,7	
105 min	7,8		7,8	
+ Kollagen-Agarose				
125 min	7,7	7,7	7,7	7,7
15 min Schütteln bei 37 °C				
150 min	8,0	8,0	8,0	8,1
210 min	8,0	8,1	8,0	8,1
270 min	8,0	8,1	8,1	8,1
	Test- Ansatz	Leer- Ansatz	Test- Ansatz	Leer- Ansatz

In Anlehnung an SKOZA wies GROTHMEYER (36) bereits auf die große pH-Abhängigkeit des Testsystems hin, indem er zeigte, daß eine Ansäuerung der Meßprobe adhäsionshemmend, eine Alkalisierung adhäsionsfördernd ist. ASTER (6) faßte dies zusammen und postulierte den pH-Wert als entscheidenden Kontrollparameter für die Beurteilung der Funktionsfähigkeit von Blutplättchen. Während dies experimentell gut belegt und nachvollziehbar ist, besteht hinsichtlich des pH-Verhaltens von Thrombozytenpräparationen nach Blutentnahme weiterhin keine Einigkeit (15, 83, 110).

Da wir nicht unter Luftabschluß arbeiteten, ist das Ansteigen des pH-Wertes möglicherweise dem CO_2 -Verlust des Plasmas an die Luft zuzuschreiben. PASCHEN et al. (72, 73) beschrieben dieses Phänomen in noch ausgeprägterer Form.

Das Zurückbleiben des pH-Wertes im Testansatz hinter dem Leeransatz um eine zehntel Einheit sehen wir bei unserer Versuchsanordnung nicht als schlüssigen Hinweis auf eine höhere Wasserstoffionenkonzentration aus dem Stoffwechsel aktivierter Thrombozyten (25, 68, 83) an. Zu viele, von uns nicht überschaubare Parameter beeinflussen den pH-Wert von Thrombozytenpräparationen neben dem oben beschriebenen CO_2 -Verlust:

Die Packungsdichte von Thrombozyten, Aktivierungsserscheinungen während der Handhabung, vor allem das Vorhandensein verschiedener Puffersysteme (Natriumcitrat, Veronalpuffer), deren Auswirkungen auf den pH-Wert sich nicht exakt schätzen lassen und eine Beurteilung von Ionenverschiebungen erschweren.

Geht man jedoch davon aus, daß die Wasserstoffionenkonzentration "in vitro" unter den geschilderten Bedingungen gegenüber dem physiologischen pH-Bereich (7,4) ab-

nimmt und dadurch die Reaktionsbereitschaft von Thrombozyten fördert, müßten im Sinne einer möglichst physiologischen Versuchsanordnung Arbeitsbedingungen, zumindest Inkubationsbedingungen unter Luftabschluß gefordert werden.

3. 3. 2

Untersuchungen zur Volumenverteilung von Thrombozyten im PRP vor und nach Durchführung des Kollagen-Agarose-Testes

Wenngleich die Bedeutung unterschiedlicher Thrombozytenvolumina und deren Verteilungsmuster noch nicht einheitlich beurteilt wird, ist doch allgemein anerkannt, daß zwischen Thrombozytenvolumen und Thrombozytenfunktion ein ursächlicher Zusammenhang besteht und daß für unterschiedliche Erkrankungen ein Unterschied des Volumenverteilungsmusters der Thrombozyten gegenüber dem von Gesunden bekannt ist (34, 47, 48, 77). Konsequenterweise forderte DAY (23), Plättchenfunktionsproben müßten sich auf eine Plättchenpopulation beziehen, wie sie eben auch bei Gesunden zirkuliert.

Diese Überlegungen veranlaßten uns Untersuchungen zur Volumenverteilung von Thrombozyten unter der Fragestellung durchzuführen, ob durch den Kollagen-Agarose-Test eine Selektion bestimmter Größenkollektive stattfindet. Wir untersuchten plättchenreiches Plasma eines Pools gesunder Probanden ($n = 6$), indem wir die Volumenverteilungskurven (2.4) vor und nach Inkubation mit Kollagen-Agarose ausplotten ließen und ihre Charakteristiken ausmaßen.

Zur Auswertung verwendeten wir die Strecken $AM/S_1S_2/S_1T/TS_2$ (Abb. 1) und bildeten aus ihren Maßen die folgenden Quotienten:

- $Q_1 : AM/S_1S_2$
kennzeichnet Steilheit und Kompaktheit der Kurve.
- $Q_2 : S_1T/TS_2$
kennzeichnet die Lage des Kurvenmaximums.

Diese Bestimmung führten wir aus dem PRP-Pool vor Inkubation mit Kollagen-Agarose 10fach durch. Im Mittel ergab sich:

$$\bar{x}Q_1 = 1,30 \ (s = 0,08), \ \bar{x}Q_2 = 0,60 \ (s = 0,03).$$

Da die Untersuchung immer im Doppelansatz durchgeführt wurde (2.6) lagen nach Durchführung zwei abhängige Meßproben vor, aus denen die Quotienten jeweils 9fach bestimmt wurden.

Im Mittel ergab sich jetzt:

$$\bar{x}Q_1 = 0,73/0,77 \ (s = 0,21/0,12)$$

$$\bar{x}Q_2 = 0,55/0,54 \ (s = 0,04/0,09) \quad (\text{Tab. 10})$$

Alle Werte der Quotienten Q_1 waren nach Inkubation niedriger als vorher. Dies bedeutet eine signifikante Abnahme des Quotienten nach Durchführung des Kollagen-Agarose-Testes. Die statistische Prüfung für den Quotienten Q_2 vor und nach Inkubation erbringt im F-Test differente Aussagen.

Es läßt sich ableiten, daß die Verteilungskurve nach Thrombozytenanlagerung flacher wurde, ihre sonstige Charakteristik aber beibehielt. Insbesondere der sich kaum ändernde Wert für Q_2 zeigt, daß die relative Besetzung der Größenklassen links und rechts des Kurvenmaximums gleich blieb.

Tab. 10

Quotienten zur Charakteristik von Thrombozyten-Volumenverteilungskurven im plättchenreichen Plasma

- vor Kollagen-Agarose-Testung:		
	Q_1	Q_2
	1,32	0,67
	1,28	0,66
	1,44	0,58
	1,37	0,58
	1,37	0,53
	1,29	0,61
	1,24	0,57
	1,16	0,59
	1,30	0,58
	1,21	0,62
$\bar{x} =$	1,30	0,60
	-----	-----
$s =$	0,08	0,03
- nach Kollagen-Agarose-Testung:		
	Q_1	Q_2
	0,61/0,74	0,59/0,35
	0,55/0,65	0,61/0,50
	0,56/0,76	0,52/0,56
	0,56/0,76	0,52/0,56
	1,00/0,93	0,61/0,54
	0,50/0,76	0,49/0,64
	0,94/0,96	0,55/0,65
	0,94/0,78	0,55/0,53
	0,88/0,59	0,52/0,57
$\bar{x} =$	0,73/0,77	0,55/0,54
	-----	-----
$s =$	0,21/0,12	0,04/0,09

Diese Ergebnisse können als Hinweis dafür gelten, daß der Kollagen-Agarose-Test keine bestimmten Größenpopulationen gesunder Thrombozyten bevorzugt. Das gilt jedoch nur für den von beiden Quotienten erfaßten mittleren Kurvenzug und nicht für den Extrembereich besonders großer, aber selten vorkommender Thrombozyten.

Inwieweit jedoch auf Grund veränderter Volumenverteilungsmuster bei verschiedenen Erkrankungen eine klassenabhängig veränderte Reaktionsbereitschaft besteht, läßt sich mit unserem Kenntnisstand nicht beurteilen.

Für gesunde Thrombozyten bestätigten sich mit unserer Analyse Ergebnisse von MANNUCI und SHARP (61), die bei Verwendung des HELLEM-Testsystems für die Thrombozytenadhäsion zu dem gleichen Ergebnis kamen. ANGELKORT et al. (3) berichteten hingegen bei Verwendung der gleichen Testmethode von einer deutlichen Volumenabhängigkeit des Testeffektes sowohl für Normalpersonen als auch für Patienten. Dabei fällt der Bereich, den ANGELKORT et al. als den mit dem größten Adhäsionspotential bezeichnen, mit dem von uns beobachteten Volumenbereich zusammen.

Weitergehende Interpretationen mit unserer Technik halten wir nicht für sinnvoll, da bei Extrapolation nach unten der Überlagerungseffekt mit dem Grundrauschen des Gerätes und bei Extrapolation nach oben das "Tresholdproblem" für den Thrombozytenkanal auftreten.

3. 3. 3

Vergleich des Einflusses von Heparin und Natrium-Citrat-Lösung auf die Thrombozytenreagibilität

Heparin beeinflusst die Thrombozyten in unterschiedlicher, uneinheitlich interpretierter Weise (4, 85). Wir untersuchten daher, ob sich Thrombozyten aus Heparin-antikoagulierten Blutproben anders als solche aus Citrat-antikoagulierten verhalten.

Im Rahmen dieses Versuches wurde 26 Normalpersonen gleichzeitig Citrat- und Heparin-antikoaguliertes Venenblut entnommen und im Kollagen-Agarose-Test untersucht. In den Vergleich gingen davon nur 23 Proben ein, da bei drei Doppelabnahmen die angereicherten Thrombozytenkonzentrationen zu stark differierten und damit ein Abnahme- oder Präparationsfehler vorzuliegen schien (Tab. 11).

Tab. 11

Vergleich der Relativanlagerungen im Kollagen-Agarose-Test aus Citrat- und Heparin-PRP

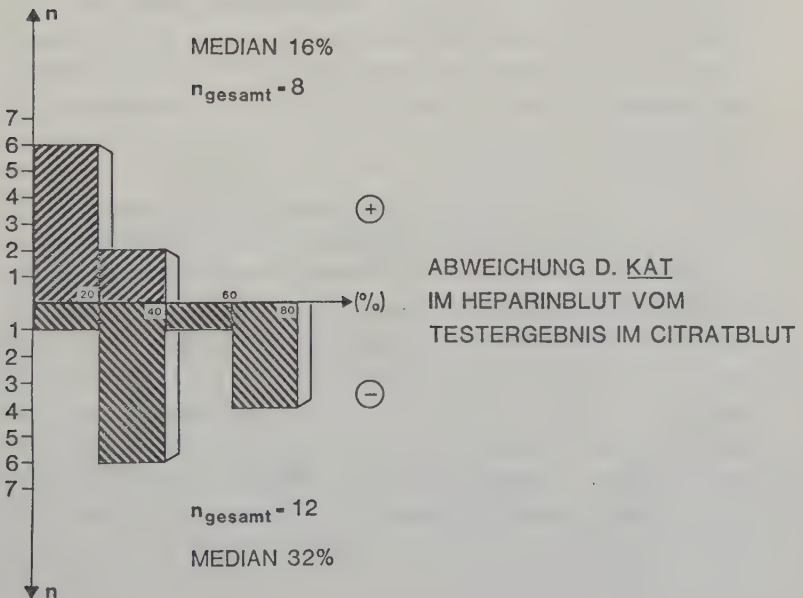
KAT im PRP aus		KAT - Diff.
Citratblut	Heparinblut	(2) - (1)
(1)	(2)	
0,260	0,300	0,040 = 15,4%
0,190	0,240	0,050 = 26,3%
0,390	0,340	- 0,050 = -12,8%
0,320	0,380	0,060 = 18,8%
0,290	0,220	- 0,070 = -24,1%
0,260	0,280	0,020 = 7,7%
0,250	0,190	- 0,060 = -24,0%
0,250	0,290	0,040 = 16,0%
0,400	0,110	- 0,290 = -72,5%
0,300	0,200	- 0,100 = -33,3%
0,260	0,180	- 0,080 = -30,8%
0,290	0,230	- 0,060 = -20,7%
0,050	0,050	± 0,000 = 00,0%
0,480	0,170	- 0,310 = -64,6%
0,200	0,120	- 0,080 = -40,0%
0,250	0,090	- 0,160 = -64,0%
0,320	0,320	± 0,000 = 00,0%
0,170	0,190	0,020 = 11,8%
0,090	0,070	- 0,020 = -22,2%
0,100	0,130	0,030 = 30,0%
0,210	0,240	0,030 = 14,3%
0,290	0,110	- 0,180 = -62,1%
0,250	0,250	± 0,000 = 00,0%

Im Paardifferenzentest unterscheiden sich beide Meßreihen signifikant ($p < 0,05$).

Das Histogramm der prozentualen Abweichung des im Heparin-PRP gemessenen Wertes vom Vorgabewert aus Citrat-PRP und die dabei ermittelten Medianwerte von 16% (positive Abweichung) bzw. 32% (negative Abweichung), sprechen für einen überwiegend hemmenden Einfluß des Heparins auf die Thrombozytenreaktivität (Abb. 17).

Abb. 17

Abweichungen der Testergebnisse aus Heparin-PRP vom Vorgabewert aus Citrat-PRP



Betrachtet man die Häufigkeitsverteilung der Kollagen-Agarose-Meßergebnisse in beiden Untersuchungsserien und klassiert nach den Thrombozytenausgangszahlen ergeben sich ebenfalls deutliche Unterschiede:

Für die Ergebnisse aus Citratplasmen zeigte sich bei Betrachtung aller Meßwerte eine symmetrische, eingipflige Häufigkeitsverteilung. Die Differenzierung nach Thrombozytenausgangszahlen ergab jedoch, daß sich dieser Verteilungstyp in den jeweiligen Bereichen nicht reproduzieren ließ und die oben beschriebene Verteilungscharakteristik aller Testergebnisse daher als zusammengesetzt zu betrachten ist (Abb. 18).

Die gleiche Verteilungsanalyse für die Meßreihe aus Heparinplasmen ergibt deutlich andere Merkmale. So läßt sich aus allen Meßwerten keine so eindeutige Verteilung darstellen. Vielmehr zeigen die Histogramme der nach Thrombozytenausgangszahlen getrennten Betrachtung, daß eine Abhängigkeit hiervon nicht zu bestehen scheint.

Daher ist eine Gleichverteilung die vielleicht beste Beschreibung der Testergebnisse aus Heparinplasmen (Abb. 19).

ZUCKER (113) berichtete, daß Heparin die Thrombozytenaggregation begünstige, daß jedoch die "Release" - Reaktion als Maß für die Aktivierung von Thrombozyten bei Stimulierung verringert werde - möglicherweise als Folge einer Heparin-induzierten Voraktivierung. In einer neueren Arbeit wiesen SALZMAN et al. (85) darauf hin, daß der Effekt von Heparin auf die Thrombozytenfunktion unterschiedlich beurteilt wird. So schrieb man dem Heparin sowohl hemmende als auch fördernde Einflüsse auf die Thrombozytenaktivierung zu. SALZMAN et al. schlugen als eine Erklärungsmöglichkeit für diese Meinungsviel-

falt die Heterogenität von Heparinpräparationen vor- und kamen in ihrer Studie zu dem Ergebnis, daß unterschiedliche Fraktionen von Heparin - getrennt nach Molekulargewicht und Affinität zu Antithrombin III - unterschiedliche Einflüsse auf die Thrombozytenfunktion hatten. Danach kommt dem Antithrombin die Wirkung eines protektiven Faktors für die Blutplättchen vor Aggregation durch Heparin zu.

Insgesamt läßt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt folgende Hypothese aufstellen, die diese in der Literatur beschriebenen und unsere eigenen Befunde erklären könnte: Heparin hat auf Thrombozyten einen aktivierenden Einfluß. Das Ausmaß der Stimulation ist dabei abhängig von der verwendeten Heparinfraktion sowie vor allem von der Plasma-Konzentration von "Antithrombin". Damit wird die originäre Thrombozytenfunktion auf zweierlei Weise modifiziert: durch die Wirkung von Heparin und von Antithrombin im Plasma. Da das Zusammenspiel dieser beiden Einflußgrößen von Plasmaprobe zu Plasmaprobe unterschiedlich sein dürfte und vor allem die Konzentration von Antithrombin insbesondere bei Patienten nicht konstant ist, sind die breitere Streuung der Kollagen-Agarose-Testergebnisse und deren vermutlich geringere Abhängigkeit von der Thrombozytenzahl erklärbar.

Die Testergebnisse aus Heparinblut sind unserer Auffassung nach daher nicht geeignet, als Routineuntersuchung die Thrombozytenfunktion von Patientenproben korrekt wiederzugeben.

Abb. 18

Verteilungsanalyse der Meßwerte aus Citrat-PRP

THZ.-ZAHL IM CITRAT-PRP:

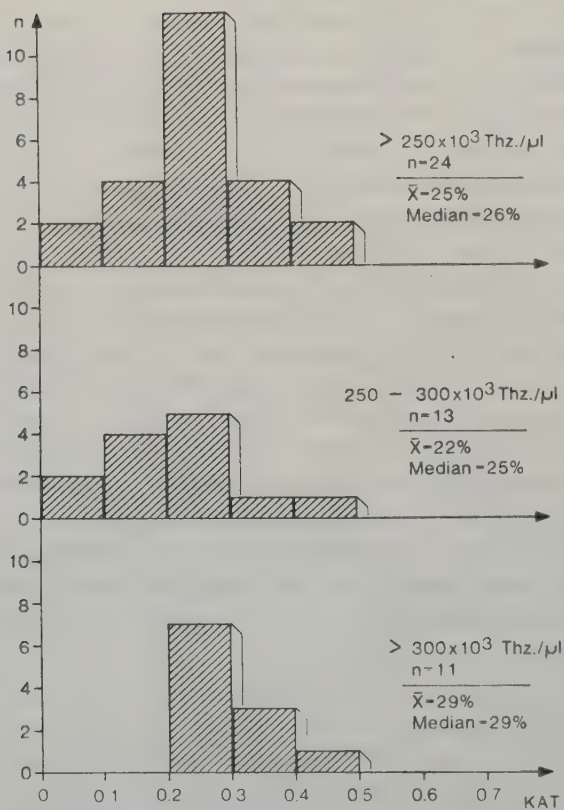
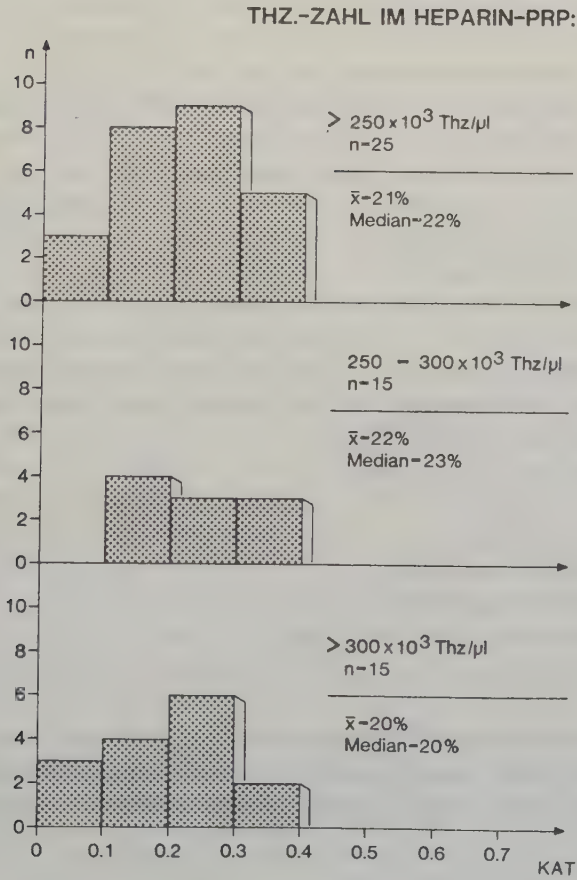


Abb. 19

Verteilungsanalyse der Meßwerte aus Heparin-PRP



3. 3. 4

Vergleich von Kollagen-Agarose-Testergebnissen mit anderen Thrombozytenfunktionsuntersuchungen

Schon GROTHEMEYER (36) untersuchte die Beziehung des Kollagen-Agarose-Testes zu anderen Thrombozytenfunktionsuntersuchungsmethoden. Für den Aggregationstest nach ROKA und den Kollagen-Agarose-Test konnte er einen signifikanten Zusammenhang darstellen, der für den Vergleich des Adhäsionstest nach HELLEM mit dem Kollagen-Agarose-Test nicht nachweisbar war.

Wir suchten ebenfalls nach einem möglicherweise existierenden Zusammenhang zwischen dieser Untersuchungsmethode und den anderen in unserem Labor durchgeführten Funktionstesten.

Insgesamt standen 26 Vergleichsmessungen hierfür zur Verfügung (Tab. 12): 13 wurden im Rahmen unserer Patientenstudien durchgeführt. Weitere 13 stammten aus der laufenden Routine unseres Gerinnungslabors und ließen sich folgendermaßen gliedern:

	n	↑	KAT	↓
Thrombophile Diathese	4	2		2
Hämorrhagische Diathese	7	3		4
Myeloproliferatives Syndrom	1	-		1
Endokarditis	1	-		1

Für die vergleichende Korrelation des Kollagen-Agarose-Testes mit der induzierten Aggregation nach BORN lag zusätzlich ein Vorversuch über fünf Vergleichsuntersuchungen vor.

3. 3. 4. 1

Beziehung zwischen induzierter Aggregation nach BORN und Kollagen-Agarose-Test (Tab. 12)

Aus einem Vorversuch mit fünf unselektierten Patienten unserer Klinik, von denen Thrombozytenfunktionsuntersuchungen durchgeführt wurden, ergab sich eine signifikante ($p < 0,05$) Korrelation zwischen Thrombozytenanlagerung und

- Transmissionsänderungen bei Zugabe von $1 \mu\text{g}$ Kollagen pro ml PRP ($r^+ = 1$).
- minimaler Aggregationsauslösedosis ADP ($r^+ = - 0,825$).

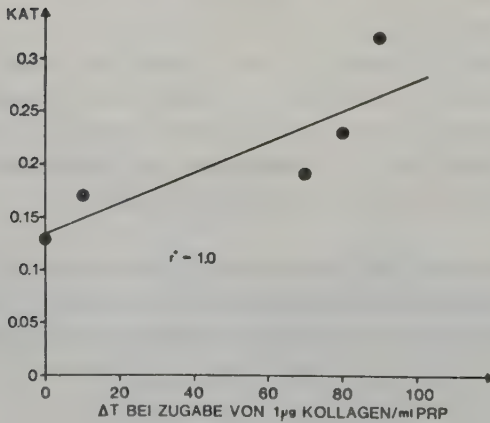
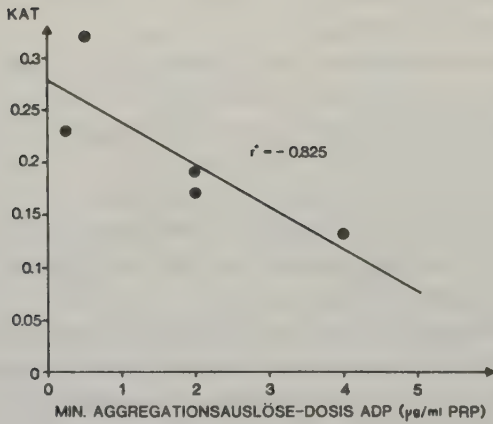
Bei dem daraufhin prospektiv unternommenen Vergleich von insgesamt 26 Messungen fanden wir folgende Ergebnisse:

1. Für die Korrelation mit der Transmissionsänderung bei Zugabe von $1\mu\text{g}$ Kollagen pro ml PRP war $r^+ = 0,3313$ und unterschritt die Schranke für $p < 0,05$ ($0,3362$) nur knapp. Eine statistisch gesicherte Korrelation wie im Vorversuch ließ sich folglich nicht reproduzieren.
2. Für die Korrelation mit der minimalen Aggregationsauslösedosis ADP war $r^+ = - 0,2276$ und unterschritt die Schranke für $p < 0,05$ ($0,3435$) deutlich. Auch für diesen Vergleich ließ sich eine statistisch gesicherte Korrelation daher nicht wiederholen.

Ein funktioneller Zusammenhang zwischen Kollagen-Agarose-Test und den Parametern der induzierten Aggregation nach BORN scheint daher nicht gegeben zu sein.

Abb. 20

Vorversuch zur Korrelation zwischen induzierter Aggregation nach BORN und Kollagen-Agarose-Test



3. 3. 4. 2

Beziehung zwischen Thrombozytenausbreitung und Kollagen-Agarose-Test (Tab. 12)

Die Korrelation der vollständig ausgebreiteten Thrombozyten in Promille mit den Untersuchungsergebnissen im Kollagen-Agarose-Test ergab: $r^+ = 0,1991$.

Diese Korrelation ist nicht signifikant von Null unterschieden. Betrachtet man jedoch nur die "Riesenformen und großen Thrombozyten" (Thrombozytendurchmesser $>10\mu\text{m}$) und korreliert beide Meßreihen erneut, ergibt sich mit $r^+ = 0,6337$ eine hochsignifikante Korrelation ($p < 0,001$). Beide Methoden scheinen daher nur für dieses Kollektiv besonders stoffwechselaktiver Thrombozyten (102) vergleichbare Resultate zu liefern.

Tab. 12

Beziehung zwischen Kollagen-Agarose-Test und induzierter Aggregation nach BORN und Thrombozytenausbreitung nach BREDDIN

P - Nr.	KAT	Transmissions- änderung (+ 1 µg/ml PRP Kollagen)	Min. ADP Aggregations- Auslösedosis	voll ausgebreitete Thrombozyten	
				"Riesenformen + Große"	Alle
		%	%	µg/ml PRP	°/oo
1	107	70	0,25	4	604
2	166	100	0,25	2	510
3	53	80	0,25	2	434
4	30	80	0,25	2	682
5	185	80	0,30	56	454
6	92	0	2,00	46	374
7	23	40	1,00	0	636
8	141	20	0,50	14	372
9	84	0	1,00	0	78
10	250	80	0,50	14	604
11	10	80	---	4	334
12	106	70	1,00	52	582
13	175	80	1,00	4	424
+ 14	274	---	---	8	284
- 15	0	90	2,00	0	322
+ 16	31	30	1,00	0	478
- 17	270	90	0,50	12	631
18	32	60	2,00	0	412
- 19	58	80	0,25	4	638
+ 20	153	90	0,75	4	722
- 21	20	60	0,25	2	570
+ 22	47	55	1,00	42	502
- 23	0	0	4,00	0	200
- 24	356	80	0,75	18	564
- 25	130	20	4,00	4	766
- 26	81	80	1,00	10	424

(+/- kennzeichnet die klinisch erwartete gesteigerte bzw. gesenkte Plättchenreagibilität.

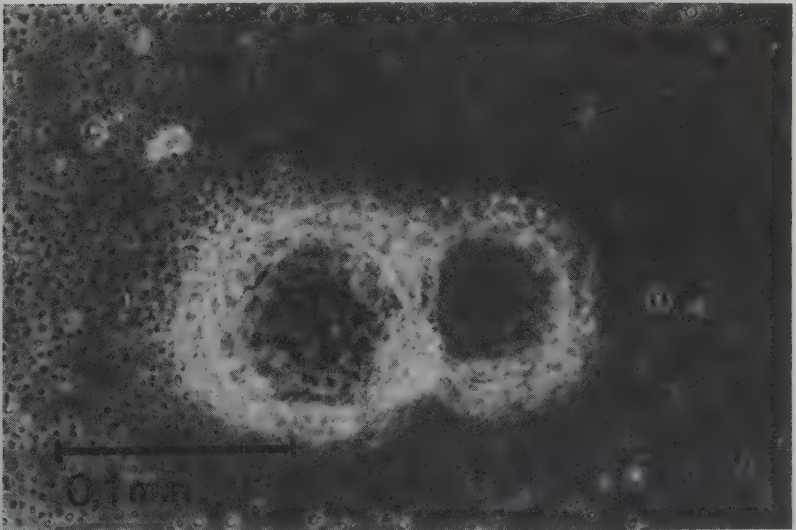
3. 3. 5

Darstellung des Testeffektes (Thrombozytenanlagerung)

Um die Thrombozytenanlagerung an Kollagen-Agarose im Vergleich zur phasenkontrastmikroskopischen Darstellung noch anschaulicher zu machen, war es notwendig eine für Thrombozyten spezifische Markierungsmethode zu benutzen. Dies gelang mit Antiserum gegen Thrombozyten einer HLA-typisierten, gesunden Probandin in der indirekten Immunfluoreszenz (2.7).

Abb. 21

Thrombozyten und Kollagen-Agarose nach Inkubation. Phasenkontrast - Vergrößerung ca. 450fach



Es zeigte sich:

- starke bis sehr starke Fluoreszenz für Thrombozyten
- keine bis schwache Fluoreszenz für Kollagenfasern auf Agarose-Partikeln
- keine Fluoreszenz für Agarose-Partikel

Das Ergebnis einer parallel durchgeführten Leerwertkontrolle, bei der die Antigen-Antikörperkomplexe durch nicht markiertes Anti-IgG abgeblockt und dann mit Fluoreszenzfarbstoff markiertem Anti-IgG nachinkubiert wurden, ergab keine Fluoreszenz und machte so eine für Thrombozyten spezifische Darstellung wahrscheinlich. Das Ergebnis dieser Darstellungsweise zeigen die folgenden Abbildungen:

Abb. 22

Thrombozyten in Fluoreszenzdarstellung - Vergrößerung ca. 1100fach

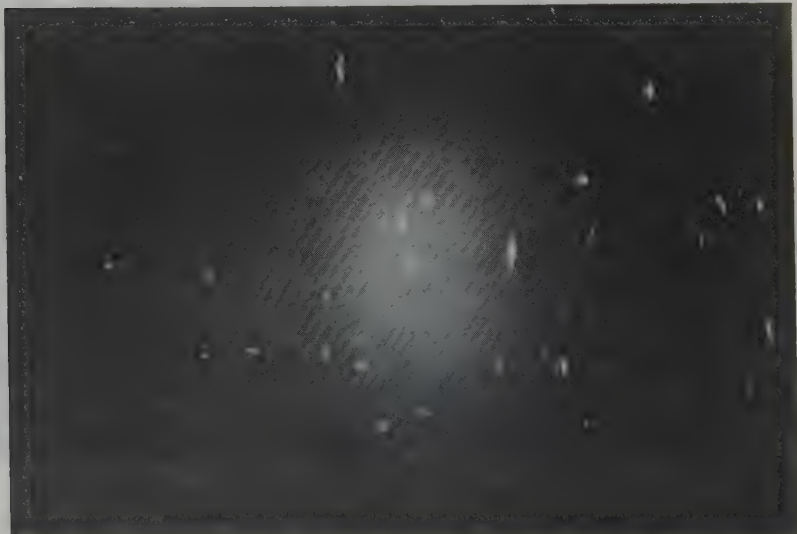
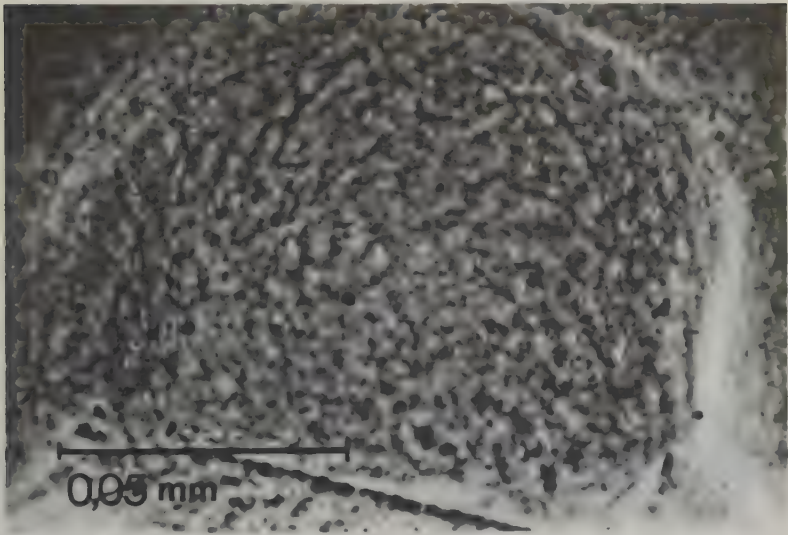


Abb. 23

a - Thrombozyten und Kollagen-Agarose nach Inkubation
Phasenkontrast - Vergrößerung ca. 1100fach



b - Fluoreszenzdarstellung - Vergrößerung ca. 1100fach

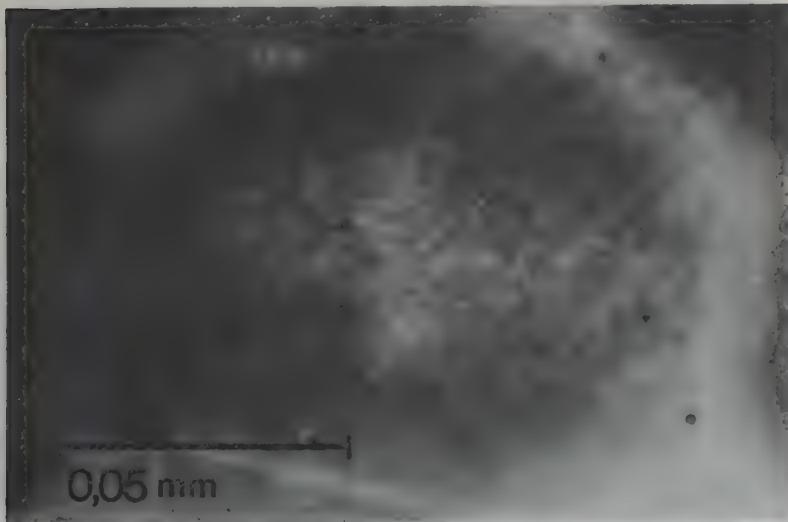
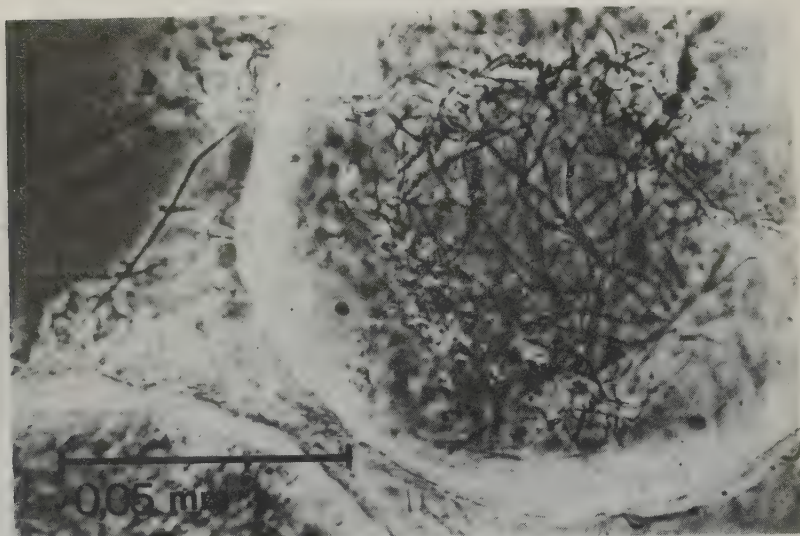
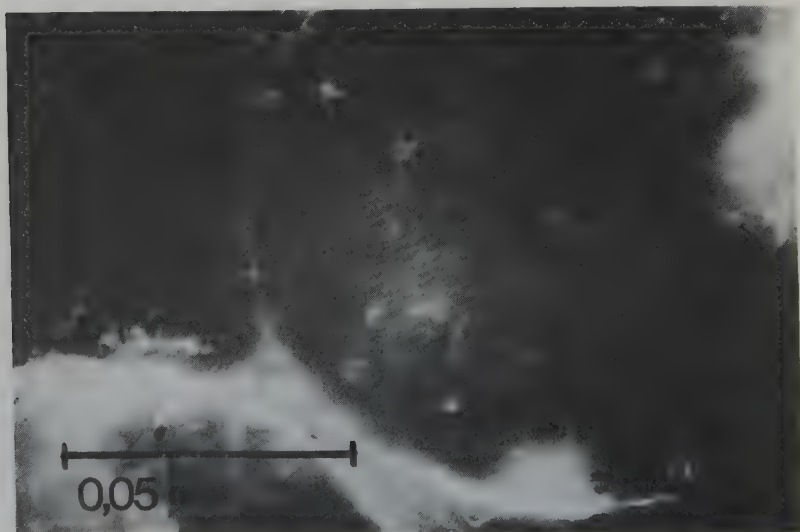


Abb. 24

a - Thrombozyten und Kollagen-Agarose nach Inkubation
Phasenkontrast - Vergrößerung ca. 1100fach



b - Fluoreszenzdarstellung - Vergrößerung ca. 1100fach



Die unterschiedliche Form der mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Thrombozyten im Ausstrichpräparat (Abb. 22) läßt sich mit der durch die Antigen-Antikörper-Reaktion zu erwartenden Plättchenalteration (Lyse) in Einklang bringen (43).

Abbildung 23 und 24 zeigen eindrucklich die koronaartige, granuläre Belegung der Kollagen-Agarose-Kugeln mit Thrombozyten, wobei die Stellen hoher Fluoreszenz die Thrombozytenanlagerung kennzeichnen.

Unsere Befunde unterstützen das von LEYTIN (59) vorgeschlagene dynamische Modell der Thrombozytenaktivierung. Darüber hinaus konnten wir auch vereinzelt Thrombozytenaggregate beobachten, so daß wir annehmen müssen, daß es sich bei dem Kollagen-Agarose-Test nicht um einen reinen Adhäsionstest handelt. Wir glauben aber, daß sich die Testaussage umsomehr auf die Adhäsion beziehen läßt, je sorgfältiger die Präparation von Kollagen-Agarose, insbesondere die Reinigung von überschüssigem, ungebundenem bzw. löslichem Kollagen erfolgt.

3. 4

Das Testsystem als Untersuchungsmethode. Patientenstudien

Besonders kam es uns darauf an, ob der Kollagen-Agarose-Test empfindlich in der Erkennung gesteigerter Thrombozytenfunktion bei thrombophilen Diathesen ist und Funktionsänderungen, auch Einschränkungen, hinreichend exakt erfaßt. Diese Eigenschaften betrachten wir als unabdingbare Voraussetzung für den Einsatz des Testes in der Therapiekontrolle von Patienten, die mit Thrombozytenaggregationshemmern behandelt werden.

Inwieweit diese Untersuchungsmethode solchen Ansprüchen gerecht wird und wie ihr klinischer Wert einzuschätzen ist, versuchten wir mit Untersuchungen an Patienten zu klären.

3. 4. 1

Kollektive

Wir haben 45 Patienten untersucht und die Ergebnisse wie in 2.8 beschrieben gegliedert. Da wir über einen statistisch definierten Referenzbereich verfügen (3.2.1.1) ist für jedes einzelne Untersuchungsergebnis eine statistisch relevante Interpretation möglich (Tab. 13). Da dies der klinischen Relevanz der Untersuchungsergebnisse am besten entspricht, haben wir auf die Darstellung einer Signifikanzanalyse der Mittelwerte unserer verhältnismäßig kleinen Patientenkollektive verzichtet und beschränken uns im Folgenden auf beschreibende statistische Parameter. Eine bewertende Diskussion schließt sich an.

3. 4. 1. 1

Patienten mit Diabetes mellitus Typ I (Abb. 25)

$n = 12$ (7 oberhalb / 1 unterhalb des Referenzbereiches)

$\bar{x} = 159,5\%$

$s = 79,8\%$

$x = 149,0\%$

3. 4. 1. 2

Patienten mit verschiedenen Stoffwechselstörungen (Diabetes mellitus Typ II, Hyperlipidämie, Hyperlipoproteinämie et al.) (Abb. 26)

$n = 8$ (5 oberhalb des Referenzbereiches)

$\bar{x} = 220,3\%$

$s = 194,0\%$

$x = 173,5\%$

3. 4. 1. 3

Patienten mit Hypertonus (Abb. 26)

$n = 9$ (6 oberhalb / 1 unterhalb des Referenzbereiches)

$\bar{x} = 148,2\%$

$s = 60,8\%$

$x = 166,0\%$

3. 4. 1. 4

Raucher (Abb. 27)

$n = 7$ (4 oberhalb des Referenzbereiches)

$\bar{x} = 148,3\%$

$s = 61,5\%$

$x = 158,0\%$

3. 4. 1. 5

Patienten mit multifaktorieller Gefährdung (Abb. 27)

n = 5 (4 oberhalb des Referenzbereiches)

$\bar{x}$ = 161,4%

s = 42,6%

x = 167,0%

3. 4. 1. 6

Patienten mit koronarer Herzkrankheit (Abb. 28)

n = 16 (4 oberhalb / 2 unterhalb des Referenzbereiches)

$\bar{x}$ = 108,1%

s = 43,7%

x = 90,5%

3. 4. 1. 7

Patienten mit verschiedenen vasoobstruktiven Erkrankungen (Abb. 28)

In dieser Gruppe wurden insgesamt 12 Patienten mit den Diagnosen "Arterielle Verschlusskrankheit (AVK)", "Cerebrovaskuläre Funktionsstörungen", "Thrombangitis bzw. Thrombose" zusammengefaßt. 5 Untersuchungsergebnisse lagen oberhalb des Referenzbereiches, 2 unterhalb.

Eine kollektive Auswertung schien nur bei 5 Patienten mit arterieller Verschlusskrankheit sinnvoll:

$\bar{x}$ = 223,6%

s = 225,9%

x = 112,0%

Abb. 25

Patienten mit Diabetes mellitus Typ I

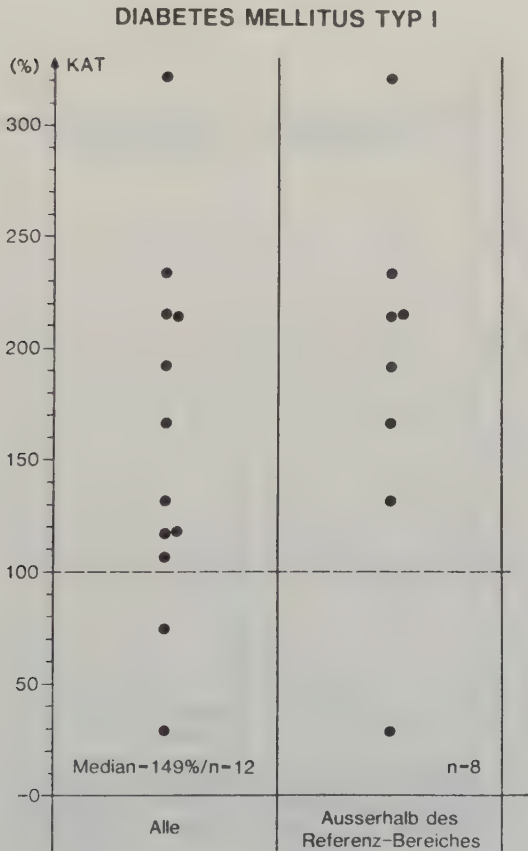


Abb. 26

Patienten mit Hypertonus / mit verschiedenen Stoffwechselstörungen

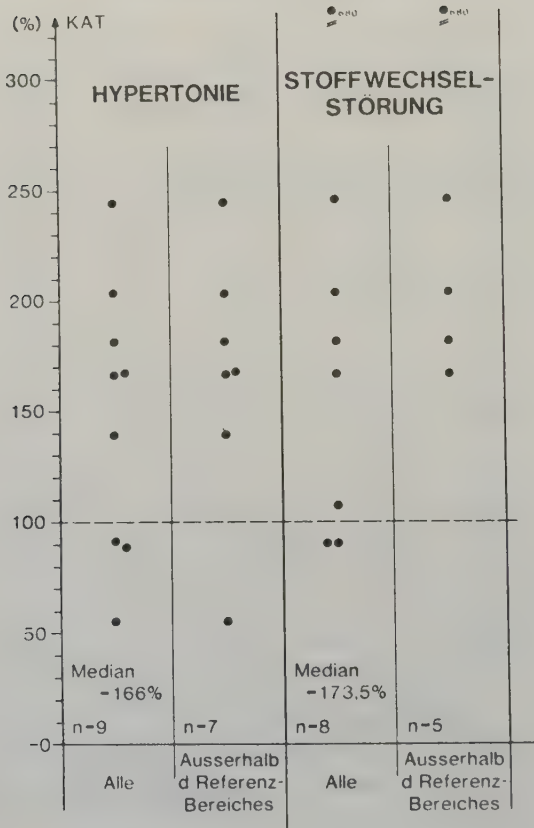


Abb. 27

Raucher / Patienten mit multifaktorieller Gefährdung

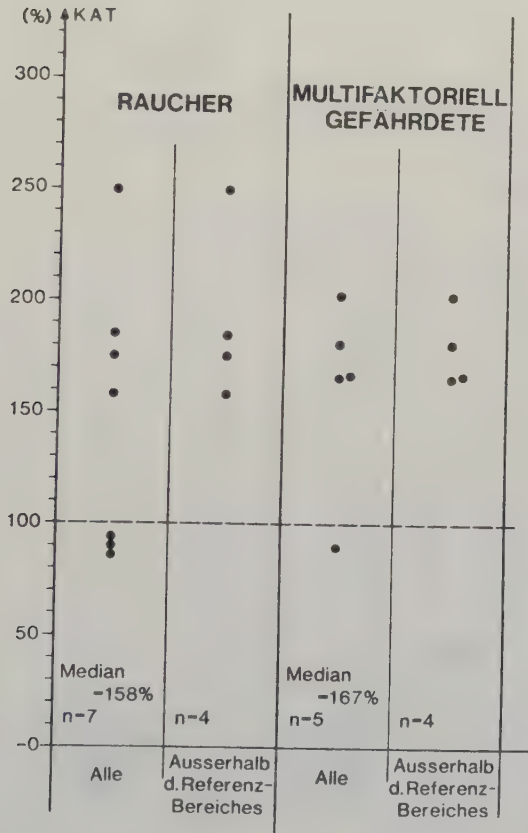
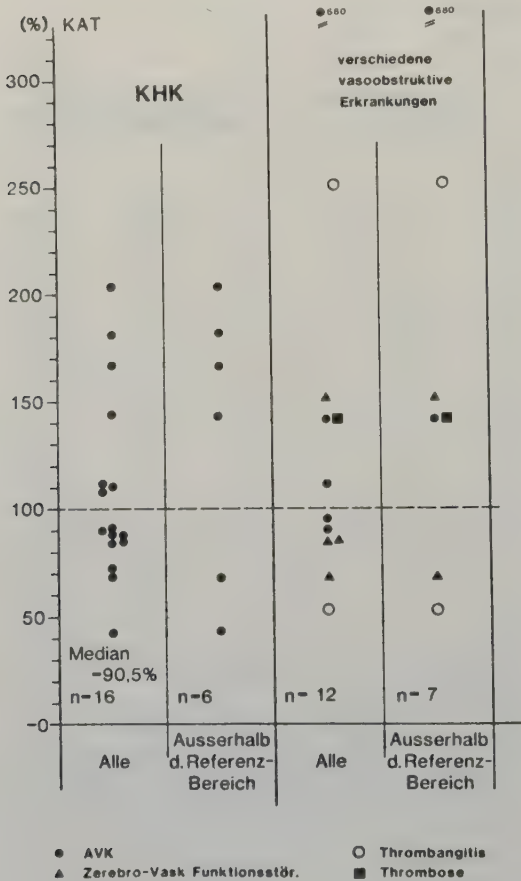


Abb. 28

Patienten mit koronarer Herzkrankheit / mit verschiedenen vasoobstruktiven Erkrankungen.



Tab. 13

Kollagen-Agarose-Testergebnisse im Rahmen der Patientenstudien

		Referenzbereich		
P-Nr.	KAT	Untergrenze	Obergrenze	
	%	%		%
zu	1	167	73	127
3.4.1.1	2	29	69	131
	3	131	70	130
	4	74	72	128
	5	106	72	128
	6	116	72	128
	7	117	71	129
	8	215	56	144
	9	320	12	188
	10	214	75	125
	11	233	76	124
	12	192	66	134
	zu	1	107	69
3.4.1.2	2	166	72	128
	3	90	70	130
	4	90	70	130
	5	181	45	155
	6	203	74	126
	7	680	12	188
	8	245	56	144
	zu	1	167	73
3.4.1.3	2	91	72	128
	3	166	72	128

Tab. 13
Fortsetzung

		KAT	Referenzbereich	
P-Nr.			Untergrenze	Obergrenze
		%	%	%
	4	181	45	155
	5	203	74	126
	6	244	2	198
	7	139	62	138
	8	88	48	152
	9	55	70	130
zu	1	94	48	152
3.4.1.4	2	158	72	128
	3	185	73	127
	4	90	70	130
	5	86	70	130
	6	250	72	128
	7	175	69	131
zu	1	167	73	127
3.4.1.5	2	90	70	130
	3	181	45	155
	4	203	74	126
	5	166	72	128
zu	1	91	72	128
3.4.1.6	2	110	72	128
	3	83	75	125

Tab. 13

Fortsetzung

		KAT	Referenzbereich	
P-Nr.			Untergrenze	Obergrenze
		%	%	%
	4	68	74	126
	5	107	69	131
	6	166	72	128
	7	90	70	130
	8	84	72	128
	9	43	69	131
	10	112	73	127
	11	181	45	155
	12	203	74	126
	13	88	74	126
	14	72	70	130
	15	88	48	152
	16	143	69	131
zu	1	90	70	130
3.4.1.7	2	141	68	133
	3	112	73	127
	4	680	12	188
	5	95	60	140

Diese Untersuchungen mit dem Kollagen-Agarose-Test an einem größeren Patientenkollektiv, das sich überwiegend aus Patienten zusammensetzte, bei denen eine gesteigerte Thrombozytenfunktion zu vermuten war, erbrachte ein zunächst überraschendes Ergebnis: Während bei der Klassifizierung nach vaskulären Risikofaktoren in allen Gruppen überwiegend gesteigerte Thrombozytenanlagerungen zu beobachten waren, konnte dies bei Patienten mit diagnostisch gesicherten Gefäßleiden nicht in gleichem Umfang festgestellt werden.

Bei Typ I - Diabetikern, Patienten mit verschiedenen Stoffwechselstörungen (z.B. Diabetes mellitus Typ II, Hyperlipidämie, Hyperlipoproteinämie), Hypertonikern und Rauchern lag der Großteil der Einzelmessungen (mindestens mehr als 50 %) oberhalb des Referenzbereiches. Die jeweiligen Mittelwerte lagen ebenfalls in allen Gruppen deutlich über 100%. Am ausgeprägtesten (statistisch signifikant) war dies für Typ I - Diabetiker, Hypertoniker oder für Patienten, die von mehreren dieser Faktoren gefährdet waren. Diese Ergebnisse lassen sich gut mit in der Literatur beschriebenen Befunden in Einklang bringen.

Seit eine mögliche Beteiligung der Thrombozyten an der diabetischen Mikroangiopathie diskutiert wird (9, 51, 97), beschäftigten sich viele Autoren mit der Thrombozytenfunktion insbesondere bei insulinpflichtigen Typ I - Diabetikern. Übereinstimmend wird die Thrombozytenfunktion dabei als gesteigert eingeschätzt (20, 93). Denkbare Erklärungsmöglichkeiten hierfür liefern Arbeiten von HALUSHKA et al. (37, 38) und BUTKUS (17), die Veränderungen des Prostaglandinstoffwechsels der Throm-

bozyten bei Diabetikern feststellten und eine gesteigerte Thromboxan A_2 -Synthese nachweisen konnten. Befunde von LAGARDE (54) ergaben zusätzlich, daß auch Plättchen diabetischer Patienten weniger empfindlich auf inhibierende Prostaglandine sind. LEVIN et al. (58) berichteten von einem Plasma-Kofaktor, der die Plättchenaggregation bei Diabetikern verstärken soll. Dieser Kofaktor könnte mit plasmalöslichen Immunkomplexen zusammenhängen, deren aggregationsfördernder Effekt bereits beschrieben wurde (112).

Zusammenfassend berichtete NORDØY (70) von der Bedeutung von Intermediärstoffwechselstörungen, Bluthochdruck und Rauchen bei der Entstehung der Atherosklerose und der Beziehung dieser Risikofaktoren zu gesteigerter Thrombozytenreagibilität. Während der Einfluß von Bluthochdruck und Rauchen auf die Plättchenfunktion zum Teil unterschiedlich bewertet wird (66, 94) bestehen solche Kontroversen für die Bedeutung des Fett- und Zuckerstoffwechsels nicht. COLEMAN (19) und WÖRENER (111) beispielsweise zeigten die Beziehung zwischen Blutfetten und gesteigerter Thrombozytenfunktion. DYERBERG (24) beschrieb den Einfluß von spezifischen Diäten (hoher Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren) auf die Interaktion von Thrombozyten und Gefäßwand.

Gänzlich anders war die Situation bei Patienten mit gesicherten Gefäßleiden:

Lediglich 4 Patienten mit koronarer Herzkrankheit hatten eine gegenüber dem Referenzbereich gesteigerte Thrombozytenadhäsivität. Der Mittelwert dieses Kollektivs war mit 108,1% ebenfalls nicht eindeutig gesteigert. Bei den an anderen vasoobstruktiven Erkrankungen leidenden Patienten ließ sich nur in Einzelfällen erhöhte Thrombozytenanlagerung finden. Dies scheint im

Gegensatz zu der einleitend beschriebenen Beteiligung von Thrombozyten an vaskulären Verschlüßleiden mit thromboembolischen Komplikationen zu stehen:

Verschiedene Autoren (30, 31, 75, 80, 100, 108) berichteten von gesteigerter Plättchenfunktion - gemessen mit verschiedenen Techniken - insbesondere bei koronarer Herzkrankheit. In neueren Arbeiten (70) war ein solch eindeutiger Zusammenhang zwischen Thrombozytenfunktion und KHK nicht reproduzierbar. Stattdessen fanden sich auch normale und sogar leicht erniedrigte Thrombozytenfunktionen. Entsprechendes gilt auch für andere Verschlüßleiden wie Arterielle Verschlüßkrankheit etc..

Ähnlich wie wir fand auch AZNAR (7), daß die Thrombozytenadhäsion an Kollagen sowohl für Patienten mit koronarer Herzkrankheit als auch mit akutem Herzinfarkt normal war. Mögen diese Befunde auch durch die nicht vorhandene Standardisierung der Testmethoden oder, wie in unserem Fall, durch mögliche medikamentöse Überlagerungen zu erklären sein, werfen sie andererseits doch die Frage auf, ob die unbestrittene, kausalpathogenetische Bedeutung der Thrombozyten bei der Entstehung und Perpetuierung vasoobstruktiver Erkrankungen nicht neu zu überdenken ist.

Denkbare Erklärungsmöglichkeiten für die Einbeziehung von Thrombozyten in den gefäßobstruierenden Prozeß wären dabei vor allem eine auf Plättchenseite möglicherweise verringerte Empfindlichkeit für antiaggregatorische Prostaglandine (99), oder veränderte Umgebungsbedingungen der Thrombozyten im betroffenen Gefäßbereich. So berichteten METHA et al. (67) von verringerter Thrombozytenfunktion und -zahl im herzvenösen, im Vergleich zum herzarteriellen Blut von Patienten mit KHK, was für

die Anlagerung und den Verbrauch von Thrombozyten im betroffenen Gefäßbett spricht. BORN (10) entwickelte ein entsprechendes pathologisches Modell:

Er zeigte, daß in Gefäßbezirken nicht laminarer Strömung, wie sie beispielsweise in atherosklerotisch veränderten Gefäßen vorliegt, Scherkräfte auftreten, die zu einer Freisetzung von ADP aus Erythrozyten führen und dadurch die Thrombozyten aktivieren können.

Diese Ergebnisse werfen in der Diskussion über die prophylaktische Anwendung von Thrombozytenaggregationshemmern (12, 13, 28, 60, 81, 105, 106) die Frage auf, ob die Senkung der Funktion normal aktiver Thrombozyten trotz möglicherweise auftretenden Nebenwirkungen wie Blutungsgefahr, den weiteren Krankheitsverlauf gefäßobstruierender Erkrankungen günstig beeinflußt.

Faßt man die mit dem Kollagen-Agarose-Test an Patienten gewonnenen Untersuchungsergebnisse zusammen, scheinen weniger die Gefäßschäden selbst als vielmehr die Risikofaktoren, von denen man weiß, daß sie zu atherosklerotischen Gefäßdefekten führen, für die Thrombozytenfunktion maßgeblich zu sein.

Konsequenterweise wäre damit über die Thromboseprophylaxe nach akuten Infarktereignissen hinaus durch den Einsatz thrombozytenfunktionshemmender Medikamente für die durch solche Risikofaktoren besonders gefährdeten Patientengruppen ein protektiver Effekt zu erwarten, der möglicherweise die Entstehung, Perpetuierung und Verschlimmerung atherosklerotischer Gefäßdefekte verhindert oder retardiert.

Unsere Untersuchungen zeigen, daß sich der Kollagen-Agarose-Test gut eignet, gesteigerte Thrombozytenfunk-

tionen als Kriterium zur Indikationsstellung für Aggregationshemmer zu erkennen. Wie die Testergebnisse der einzelnen Patientengruppen zeigen, war es dabei einfach, gesteigerte, normale und gesenkte Funktionszustände auf Grund unseres statistischen Beurteilungsmodells zu diskriminieren.

3. 4. 2

Verlaufsbeobachtungen der Thrombozytenfunktion im Kollagen-Agarose-Test am Beispiel ausgewählter Patienten

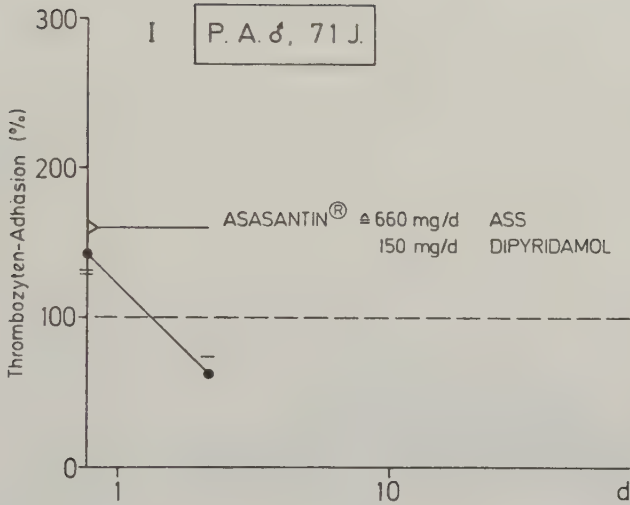
Im folgenden werden Verläufe der Thrombozytenfunktion der Patienten dargestellt, die im Rahmen dieser Arbeit mehrfach untersucht wurden. Im Hinblick auf die unter 3.4 skizzierten Fragen sollten vor allem Änderungen der Testergebnisse in Abhängigkeit therapeutischer Maßnahmen wie Medikamentengaben, Infusionen, chirurgischen Eingriffen etc. protokolliert werden.

Vorgehen:

Ausgehend von einem unter Basistherapie erhobenen Testwert wurden die Tage bis zur Wiederholungsmessung, ebenso wie die in zehn Tagen vor dem jeweiligen Wiederholungswert (WW) veränderten Therapiemaßnahmen, von denen eine Thrombozyten beeinflussende Wirkung als gesichert gelten kann, registriert und graphisch aufgetragen. Die sich dabei ergebenden Verlaufsprofile zeigt Abb. 29 (a-f).

Dargestellt wurden die Kollagen-Agarose-Testwerte, die bei Werten außerhalb des Referenzbereiches geltenden Ober- (Doppelstrich) bzw. Untergrenzen (Einfachstrich), therapeutische Maßnahmen sowie ergänzende Befunde.

Abb. 29a



Patient I (Abb. 29a)

Diagnose:

Koronäre Herzkrankheit, angiographisch gesichertes Stadium IV.

Basistherapie:

Visken
Adalat
Trental
Ismo
Isoket
Nepresol
Dihydergot
Moduretik
Lanitop
Anafranil
Dalmadorn

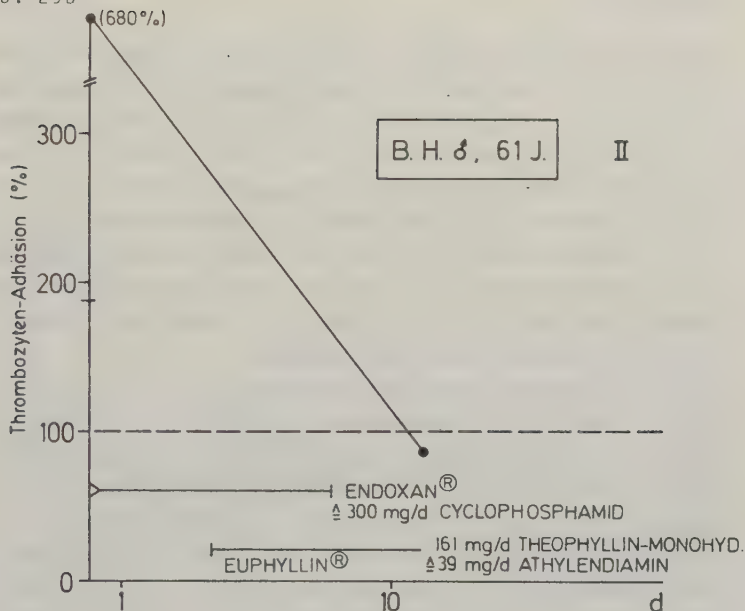
Therapieänder.:

Asasantin

Ergebnisse:

Nach einem ersten Untersuchungsergebnis, das über der zugehörigen Obergrenze des Referenzbereiches lag, ergab sich bei der nach drei Tagen unter Gabe von Asasantin durchgeführten Wiederholungsmessung ein unter der Untergrenze des Referenzbereiches liegender Thrombozytenbefund. Die Thrombozytenzahlen im PRP waren nicht deutlich verändert und lagen bei 412 500 bzw. 333 000 Thz./ μ l.

Abb. 29b



Patient II (Abb. 29b)

Diagnose:

Arterielle Verschußkrankheit, Stadium II / Hyperlipoproteinämie, Typ V / Diabetes Mellitus, Typ II / Nephrotisches Syndrom bei mesangioproliferativer Glomerulonephritis / V.a. kongestive Kardiomyopathie / Polyneuropathie.

Basistherapie:

Colfarit
Heparin
Isoket
Tavegil
Digimerk
Decortin

Lasix
Longasteril
Kalinor

Therapieänder.:

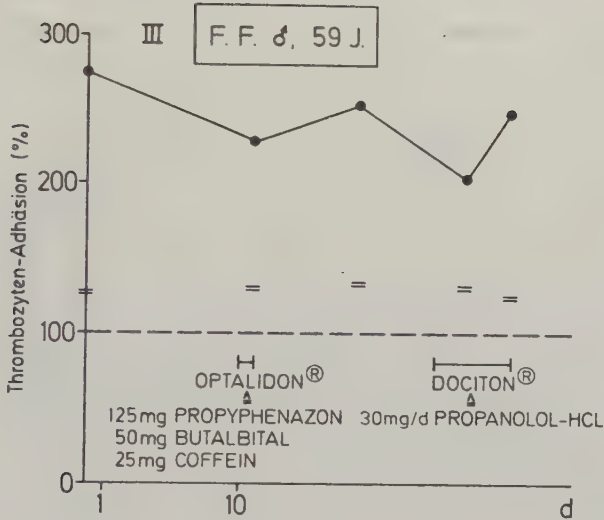
Endoxan
Euphyllin
(Nystatin)
Vollbluttransfusion

Ergebnisse:

Unter der Basismedikation, die sicher thrombozytenhemmend wirkt (Colfarit!), ließ sich trotz relativer Thrombopenie (130 000 Thz./ μ l PRP) und damit verbundener schlechter werdender Diskriminationsfähigkeit des Testsystems eine erheblich gesteigerte Thrombozytenaktivität feststellen. Die Wiederholungsmessung nach 11 Tagen, während derer der Patient zusätzlich die oben genannten Medikamente, insbesondere das Zytostatikum "Endoxan" erhielt, lag bei höheren Thrombozytenzahlen im PRP (224 000 / μ l) im Referenzbereich.

Der erste erheblich gesteigerte Meßwert von 680% wurde bereits mehrfach im Abschnitt "Kollektive" berücksichtigt. Der Variationskoeffizient der Doppelbestimmung von 0% zeigte, daß es sich nicht um einen methodisch bedingten Ausreißer handelt. Die zugehörige Obergrenze des Referenzbereiches war bei der geringen Thrombozytenausgangszahl mit 188% zwar hoch, wurde von dem Testwert jedoch deutlich übertroffen. Daß es sich tatsächlich um eine exzessiv gesteigerte Thrombozytenfunktion zu handeln schien, belegt auch die starke Senkung des Testergebnisses im Therapieverlauf.

Abb. 29c



Patient III (Abb. 29c)

Diagnose:

V.a. kongestive Kardiomyopathie / Chronische Pyelonephritis rechts / Axiale Gleithernie mit Refluxösophagitis / Osteochondrotische und spondylotische Veränderungen im Bereich der gesamten Wirbelsäule / Foramina-einengung HWK 4 - 6 / Rechtskonkave Skoliose / Zahngranulom / Innenohrschwerhörigkeit

Basistherapie:

Adalat	Solu-Decortin
Beloc	Valium
Tavegil	Eukodal
Isoket/Isoket ret.	

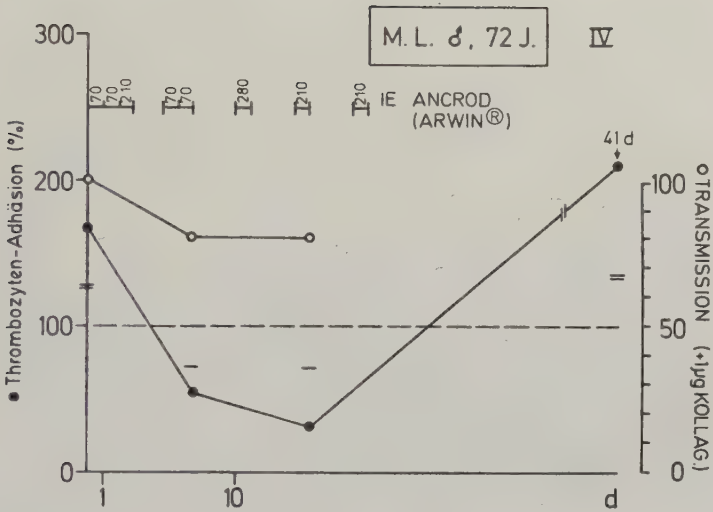
Therapieänder.:

Optalidon	
(Gastrozepin)	für WW Nr. 1,2
Dociton	für WW Nr. 3,4

Ergebnisse

Eine unter Basistherapie deutlich gesteigerte Thrombozytenfunktion zeigte sich bei einer elf Tage später durchgeführten Wiederholungsmessung nach Gabe von Optalidon und Gastrozepin von 275 auf 228 Prozent leicht gesenkt. Nach sieben Tagen ohne Therapieänderung war dieser Wert wieder auf 252 Prozent angestiegen. Nach einer weiteren Woche, während der der Patient zusätzlich Dociton erhielt, war das Testergebnis auf 203 Prozent abgesunken. Ein drei Tage später durchgeführter Kollagen-Agarose-Test erbrachte jedoch eine wieder auf 247 Prozent gestiegene Thrombozytenfunktion. Alle fünf Testwerte lagen deutlich über den jeweiligen Obergrenzen des Referenzbereiches. Die Veränderungen des Untersuchungsergebnisses übersteigen jeweils den methodischen Fehler und sind daher relevant.

Abb. 29d



Patient IV (Abb. 29d)

Diagnose:

Angina pectoris gravis / Koronare Herzkrankheit, angiografisch gesichertes Stadium III / V.a. Vertebrobasiläre Insuffizienz / Arterielle Hypertonie / Diabetes Mellitus, Typ II / Z. n. Amaurosis fugax / Z.n. Myokardinfarkt ('76/'79) / Z.n. aortokoronarem By-Pass ('79) / Z.n. erosiver Gastritis bei Hiatusgleithernie

Basistherapie:

Tenormin	Moduretik
Adalat	Paspertin
Heparin	Gelusilac
Corvaton	Agiolax
Dihydergot retard	
Lexotanil	
Adumbran	
Mogadan	

Therapieänder.:

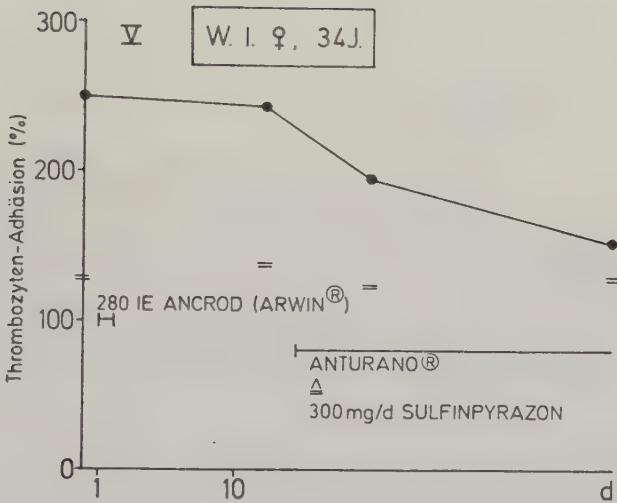
Arwin für alle WW

Ergebnisse:

Ein erster unter Basismedikation erhobener Kollagen-Agarose-Testwert war gegenüber dem Referenzbereich deutlich gesteigert. Unter Arwintherapie ließ sich ein Absinken der Werte in subnormale Bereiche feststellen. Nach Klinikentlassung und 41 Tagen nach Ersttestung lag das Untersuchungsergebnis wiederum deutlich über dem Ausgangswert. Die Thrombozytenzahlen bewegten sich zwischen 640 000 und 477 000 Thz./ μ l PRP.

Während des Klinikaufenthaltes des Patienten wurden parallel Aggregationsbefunde nach BORN erhoben: Initial zeigte sich ebenfalls ein leichtes Absinken der Licht-Transmission bei Zugabe von einem μ g Kollagen pro ml PRP, das jedoch nicht weiter progredient war und damit nicht dem Kollagen-Agarose-Test folgte. Die Aggregation der Thrombozyten war daher im Verlauf ebenfalls geringer als zu Beginn.

Abb. 29e



Patient V (Abb. 29e)

Diagnose:

Periphere akrale Durchblutungsstörungen (Morbus BÜRGER)
/ Nekrosen der Zehenendglieder / Adipositas / Raucher
(ca. 60 cig/d)

Basistherapie:

Arwin
Adalat
Liquemin
Valium
Eukodal
Fortral
Valoron
Limbatriil
Dolantin
Neurocil
Liquidepur

Therapieänder.:

Anturano

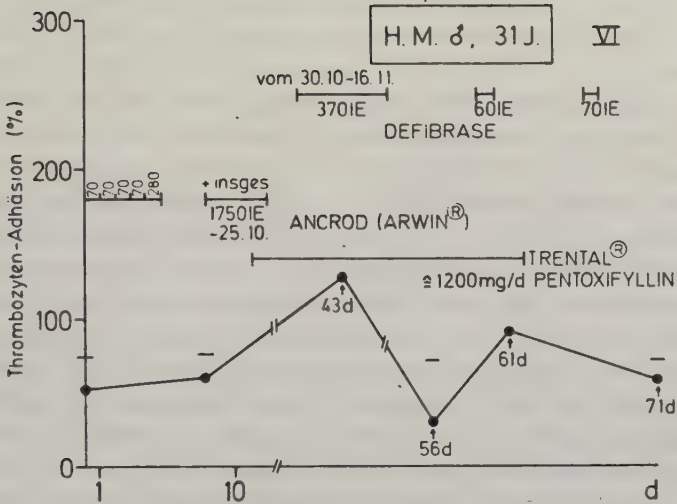
für WW 2,3

Ergebnisse:

Initial zeigte die Patientin im Kollagen-Agarose-Test eine deutlich gesteigerte Thrombozytenaktivität. Auch ein Wiederholungswert unter gleichbleibender Therapie war nicht wesentlich gesenkt, was beim erhöhten Anfall von Fibrinogenspaltprodukten unter Arwin durchaus zu erwarten gewesen wäre (36).

Nach Absetzen der Arwintherapie und Beginn einer Anturanomedikation ließ sich aber nach 19 Tagen ein Absinken des Wertes von zuletzt 243 auf 195 Prozent feststellen. Ein letzter Testwert nach 35 Tagen zeigte nochmals einen niedrigeren, deutlich der oberen Normalgrenze genäher-ten Wert von 153 Prozent. Die Thrombozytenzahlen im PRP lagen konstant in einem unauffälligen Bereich (315/423/357,5/295 x 10³ Thz./µl).

Abb. 29f



Patient VI (Abb. 29f)

Diagnose:

Thrombangitis obliterans (Morbus BÜRGER) / Z.n. Zehenamputation / Z.n. rechtsseitiger Nierenarterienstenose.

Basistherapie:

Dolviran
Valoron
Dolantin
Fortral
Wobenzym
Vitamin A

Therapieänder.:

Arwin	für WW 1
Defibrase	für WW 2, 3, 4, 5
Trental	für WW 2, 3, 4

Ergebnisse:

Unter massiv thrombozytenaggregationshemmender Medikation und normalen Thrombozytenzahlen im PRP (333 000 / μ l) fanden wir bei diesem Patienten zunächst eine erniedrigte Thrombozytenanlagerung. Auch während einer Arwintherapie ließ sich acht Tage später ein nahezu unveränderter Wert beobachten. Unter dem klinischen Bild der Resistenzbildung auf Arwin erfolgte für die folgenden 35 Tage eine Umstellung des Patienten auf Defibrase unter zusätzlicher Gabe von Trental. Der nach 35 Tagen bestimmte Wiederholungswert war deutlich angestiegen, überschritt aber den Referenzbereich nicht. Nach weiteren 13 Tagen bei gleichbleibender Therapie, aber ansteigenden Thrombozytenzahlen (über 428 000 auf nunmehr 473 000 / μ l PRP) sank das Untersuchungsergebnis wieder deutlich auf subnormale Werte von 30 Prozent ab, normalisierte sich in den folgenden fünf Tagen, um bei einer weiteren Kontrolle nach Klinikentlassung unter weitgehend ähnlicher Therapie wieder unter den Referenzbereich abzusinken.

Die Verlaufsbeobachtungen bei ausgewählten Patienten mit dem Kollagen-Agarose-Test zeigen, daß

1. mit dem Test die Thrombozytenfunktion gut im Verlauf darstellbar und damit eine Therapiekontrolle möglich ist.
2. das Untersuchungsergebnis von Medikamenten unterschiedlicher Wirkgruppen beeinflußt wird. So beobachteten wir unter der ergänzenden Therapie mit Asasantin, Anturano, Endoxan, Dociton und Arwin in unterschiedlichem Ausmaß gesenkte Thrombozytenfunktionsergebnisse. Am stärksten und ausgeprägtesten war dies für das Zytostatikum "Endoxan" zu beobachten, während die Verwendung von Arwin unterschiedliche, zum Teil entgegengesetzte Ergebnisse zeigte. Eine Verminderung der Thrombozytenanlagerung unter Arwin scheint zumindest "in vitro" plausibel zu sein, da der hemmende Einfluß von Fibrinogenspaltprodukten, wie sie nach Arwingaben zu erwarten sind, beschrieben ist (36).

Weitergehende Interpretationen pharmakologischer Wechselwirkungen mit den Thrombozyten lassen unsere Untersuchungen nicht zu.

Der klinische Wert einer Untersuchungsmethode, insbesondere einer unter "in vitro"-Bedingungen arbeitenden, läßt sich an ihrer Validität messen, d.h. daran, ob das mit dieser Methode erhaltene Untersuchungsergebnis tatsächlich ein Maß für das ist, was der Test zu messen vorgibt. Für eine "in vitro"-Methode ist dies die Übertragbarkeit des Testergebnisses auf "in vivo"-Bedingungen. Auch für den Kollagen-Agarose-Test halten wir hier höchste Zurückhaltung für angebracht. CHEN et al. (18)

zeigten, daß bereits der Vergleich von Methoden, von denen allgemein angenommen wird, daß sie "in vivo"-Bedingungen verhältnismäßig gut widerspiegeln ("Circulating Platelet Aggregates", "Beta-Thromboglobulin") mit "in vitro"-Bedingungen nur einen verhältnismäßig geringen Zusammenhang zeigt. Dies mag die Interpretationsschwierigkeiten der Relevanz von "in vitro"-Testbefunden zur Thrombozytenfunktion erklären.

Die besondere Problematik der Beurteilung der Thrombozytenfunktion als Träger der zellulären Blutgerinnung läßt sich jedoch am besten mit den Methoden der Systemanalyse (114) zeigen:

Betrachtet man die zelluläre Blutgerinnung als ein komplettes Subsystem der Hämostase, so ist es bereits eine grobe Vereinfachung, den Thrombozyten als ausschließliches Untersuchungsobjekt zu beanspruchen. Dabei ist zu bedenken, daß gerade er als offenes System zu gelten hat, das mit hämodynamischen, d.h. strömungstechnischen Faktoren, ebenso wie mit blutökologischen, d.h. vor allem stoffwechselabhängigen Faktoren interferiert. Damit wird das testbare Output des Thrombozyten zu einer Funktion des Inputs, das unter "in vivo"- bzw. "in vitro"-Testbedingungen gänzlich verschieden ist.

Die Fülle an Input-Kanälen des Thrombozyten machen seine Funktion zu einer dynamischen, feinregulierten Größe. Letztendlich ist es jedoch die Vernetzung der Einzelkomponenten und Subsysteme der zellulären Blutgerinnung und ihre Integration im Gesamtsystem, die eine Beurteilung über einen stellvertretenden Testparameter wie die Thrombozytenfunktion nur mit systemanalytisch bedingter Unschärfe zulassen:

Wenn mehrere Merkmale in eine Untersuchungsmethode beispielsweise einen Funktionstest eingehen, läßt das Un-

tersuchungsergebnis nur grobe Rückschlüsse auf die beteiligten Einzelfaktoren zu. Für das untersuchte Funktionssystem, d.h. das Zusammenspiel dieser Einzelfaktoren, ist das Testergebnis jedoch weit relevanter, als es eine noch so genaue Untersuchung eines Faktors allein je sein könnte. Berücksichtigen wir diese Überlegungen, so gilt es in der Beurteilung des zellulären Gerinnungsstatus eine Möglichkeit zu finden, die einen optimalen Kompromiß hinsichtlich der Übertragbarkeit und Bedeutung der Testaussage für das Gesamtsystem der zellulären Blutgerinnung einerseits und der Genauigkeit der Messung des jeweiligen Testparameters andererseits zu finden. Wir schließen uns dabei der Wertung von CHEN et al. (18) an, daß dieses Ziel am besten über die Verwendung einer Testbatterie, bestehend aus mehreren Untersuchungsmethoden zu erreichen sei.

Betrachtet man den Kollagen-Agarose-Test als eine in einer solchen Batterie durchgeführte Untersuchung, so konzipieren wir ihm aufgrund unserer Resultate eine klare Verbesserung unserer Interpretationssicherheit von Thrombozytenfunktionsbefunden.

Darüber hinaus zeigte sich, daß der Kollagen-Agarose-Test sich gut dazu eignet, Verlaufsprofile der Thrombozytenfunktion bei solchen Patienten zu erstellen, bei denen eine gesteigerte Thrombozytenfunktion eine bestehende Grunderkrankung verschlimmern könnte und bei denen thrombozytenfunktionshemmende Medikamente verabreicht werden. Beziehen wir unsere Erfahrungen mit der dargestellten Untersuchungsmethode aus der routinemäßigen Anwendung im Labor mit in die Bewertung ein, so

scheinen die eingangs postulierten Forderungen

- sichere Erkennung gesteigerter Thrombozytenfunktion bei thrombophilen Diathesen und
- Eignung zur Kontrolle von antiaggregatorischen Therapien bei eben diesen Erkrankungen

erfüllt zu sein.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Die Entscheidung, einen Patienten mit Thrombozytenaggregationshemmern zu behandeln, hängt unter anderem vom Ergebnis der Thrombozytenfunktionsuntersuchung ab. Die Thrombozytenfunktion wird in unserem Labor hinsichtlich der Teilaspekte Retraktion, Ausbreitungsfähigkeit und Aggregation untersucht. Eine verlässliche Methode für die Plättchenadhäsion stand bislang nicht zur Verfügung. Daher untersuchten wir einen Test, der auf der Plättchenadhäsion an insolubilisiertes Kollagen beruht, im Hinblick auf seine klinische Aussagefähigkeit und Brauchbarkeit.

Berechnet wird dabei die relative Thrombozytenanlagerung aus den Thrombozytenzahlen vor und nach Inkubation mit Kollagen-Agarose unter definierten Bedingungen.

Wir fanden eine enge, lineare Beziehung zwischen relativer Anlagerung und Thrombozytenausgangszahl.

Wesentlich für die Reproduzierbarkeit der Methode war das Einhalten der folgenden Bedingungen:

- Verarbeitung der Blutprobe in den für Thrombozytenfunktionsuntersuchungen üblichen drei Stunden nach Blutentnahme
- die exakte Zählung der Thrombozyten
- konstante Inkubationstemperatur (37 °C) unter gleichförmigen Mischbedingungen (z.B. Schüttelwasserbad)

zu vernachlässigen waren:

- Alter der Kollagen-Agarose (Stabilität bis zu 400 Tagen)
- Standzeit des Testansatzes nach Inkubation

Die Verwendung von Heparin statt Natriumcitrat als Antikoagulans beeinflusste die Adhäsion in unterschiedlicher, nicht vorhersehbarer Weise. Bei der überwiegenden Mehrzahl der untersuchten Patienten fand sich eine Hemmung.

Wir haben den Kollagen-Agarose-Test mit anderen Thrombozytenfunktionsuntersuchungsmethoden verglichen. Dabei ließ sich keine Korrelation zur Thrombozytenaggregation nach BORN sichern. Für die Thrombozytenausbreitung bestand eine signifikante Korrelation, jedoch nur für den Vergleich mit Riesenformen.

Mit gepoolten Thrombozyten gesunder Spender fanden wir eine "Intra-Assay"-Varianz der Methode von etwa 11%. Die Variationskoeffizienten aus 88 Doppelbestimmungen verschiedenen Probanden lagen im Median bei 10,5%.

Als Referenzbereich definierten wir den doppelten Schätzfehler von X auf Y der Regression zwischen Relativanlagerung und Thrombozytenausgangszahlen bei Gesunden. In diesem Referenzbereich sind ca. 95% aller dabei beobachteten Werte enthalten. Auf der Grundlage dieses Bereiches interpretierten wir die Ergebnisse unserer Patientenstudie:

Eine gesteigerte Thrombozytenreagibilität fanden wir vor allem bei Patienten mit vaskulären Risikofaktoren wie Diabetes Mellitus Typ I, Fettstoffwechselstörungen,

Hypertonie, Rauchen und bei der Kombination dieser exogenen und endogenen Risikofaktoren. Bei Patienten mit vasoobstruktiven Erkrankungen wie z.B. Koronare Herzkrankheit konnten wir eine solche Steigerung nur in Einzelfällen nachweisen.

Bei ausgewählten Patienten wurde der Kollagen-Agarose-Test mehrfach im Verlaufe der Therapie durchgeführt. Dadurch konnten wir feststellen, daß Änderungen der Therapie (z.B. Gabe von Antiaggregantien) mit unserem Adhäsionstest eindeutig erfaßbar waren.

Insgesamt hat sich der Kollagen-Agarose-Test als einfach durchzuführende, gut reproduzierbare und verläßliche Methode in der Diagnostik von Thrombozytenfunktionszuständen und bei der Beurteilung von Therapieverläufen bewährt. Wir bewerten ihn daher, nicht zuletzt wegen seiner Abgrenzung von der Aussage anderer Thrombozytenfunktionsuntersuchungsmethoden, als Bereicherung unseres Untersuchungsspektrums.

5 L I T E R A T U R

- 1 ABERNATHY L.
"Pooled Donor Control for Platelet Aggregometry"
Thromb. Haemostasis 39 (1978) 246
- 2 AMODEO P., ANGELICO F., ARCA M., RICCI G.
"Circulating Platelet Aggregates in an Adult Population"
Atherosclerosis 35 (1980) 375
- 3 ANGELKORT B., WENZEL E., BUSCHSIEWEKE U., PILLING U., MAURIN N.
"Vergleichende Untersuchungen über die Volumenhäufigkeitsverteilung funktionsgeschädigter Thrombozyten"
Med. Welt 26 (1975) 1702
- 4 ANSELL J., DEYKIN D.
"Heparin-Induced Thrombocytopenia and Recurrent Thromboembolism"
Am. J. Hematol. 8 (1980) 325
- 5 ASHMAN B.
"An assesment of platelet counting methods"
Med. Lab. Sci. 33 (1976) 201
- 6 ASTER R.H.
"Which are the Parameters to be Controlled in Platelet Concentrates in Order that They May be Offered to the Medical Profession as a Standardized Product with Specific Properties?"
Vox Sang. 40 (1981) 115

- 7 AZNAR J., VILLA P., RUEDA E.
 "Platelet Adhesiveness in Ischemic Heart Disease"
 Haemostasis 8 (1979) 38

- 8 BALLEISEN L., MARX R., KÜHN K.
 "Über die stimulierende Wirkung von Kollagen und
 Kollagenderivaten auf die Ausbreitung und Folien-
 adhäsion von Thrombozyten in defibrinogenisiertem
 Menschencitratplasma und in tierischen Citrat-
 plasmen"
 Blut 31 (1975) 95

- 9 BETTERIDGE D.J., ZAHAVI J., JONES N.A., SHINE B.,
 KAKKAR V.V., GALTON D.J.
 "Platelet function in diabetes mellitus in rela-
 tionship to complications, glycosylated haemoglo-
 bin and serum lipoproteins"
 Eur. J. Clin. Invest. 11 (1981) 273

- 10 BORN G.V.R.
 "Biochemical and Pharmacological Aspects of Hae-
 mostasis and Thrombosis"
 Kolloquium der Forschergruppe "Diabetes", München
 (1981)

- 11 BREDDIN K., BÜRK K.H.
 "Zur Klinik der Thrombozytenfunktionsstörungen
 unter besonderer Berücksichtigung der Ausbrei-
 tungsfähigkeit der Thrombozyten an silikonisier-
 ten Glasflächen"
 Thromb. Diath. Haemorrh. 9 (1963) 525

- 12 BREDDIN K., LOELIGER E.A.
"Sekundärprophylaxe nach überstandenen Reinfarkt-Antikoagulantien oder Thrombozytenfunktionshemmer?"
Internist 21 (1980) 399

- 13 BREDDIN K.
"Pro-Kontra: Antikoagulantien oder Thrombozytenfunktionshemmer in der Prophylaxe des Herzinfarktes?"
Internist 21 (1980) 394

- 14 BUCHER H.J.
"Qualitätskontrolle im hämatologischen Labor"
Schweiz. Med. Wochenschr. 102 (1972) 1857

- 15 BÜTTNER H.
"Statistische Qualitätskontrolle in der klinischen Chemie"
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 5 (1967) 41

- 16 BÜTTNER J., BORTH R., BOUTWEL J.H., BROUGHTON P.M.G.
"Provisional Recommendation on Quality Control in Clinical Chemistry"
in
"International Federation of Clinical Chemistry, Section No.3"
herseg. v. SARIS NILS-ERIK
CLIN. CHIM. ACTA 63 (1975) 108

- 17 BUTKUS A., SKRINSKA V.A., SCHUHMACHER O.P.
"Thromboxane Production and Platelet Aggregation in Diabetic Subjects with Clinical Complications"
Thromb. Res. 19 (1980) 211

- 18 CHEN Y.-C., WU K.K.
"A Comparison of Methods for the Study of Platelet
Hyperfunction in Thromboembolic Disorders"
Br. J. Haematol. 46 (1980) 163
- 19 COLMAN R.W.
"Platelet Function in Hyperbetalipoproteinemia"
Thromb. Haemostasis 39 (1978) 284
- 20 COLWELL J.A., NAIR R.M., HALUSHKA P.V., ROGERS
C., WHETSELL A., SAGEL J.
"Platelet adhesion and aggregation in diabetes
mellitus"
Metabolism 28 Suppl. 1 (1979) 394
- 21 CRONBERG S.
"Methodological Problems in Testing of Platelet
Adhesiveness"
Scand. J. Haematol. 4 (1967) 385
- 22 DAY H.J., HOLMSEN H., ZUCKER M.B.
"Platelet Function Testing"
DHEW Publication No. (NIH) 78-1087
- 23 DAY H.J., HOLMSEN H., ZUCKER M.B.
"Report of the working party on platelets"
Thromb. Haemostasis 36 (1976) 263
- 24 DYERBERG J.
"Platelet-vessel wall interaction: influence of
diet"
Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.) 294 (1981)
373

- 25 ERIKSSON L., HÖGMAN C.F., BUSCH C.
"Lack of Conformity in the Behaviour of Platelets during Normal Storage Conditions at 22 °C"
Vox Sang. 40 (1981) 65
- 26 FOLTS J.D.
"Platelet Aggregation in stenosed coronary or cerebral arteries: a mechanism for sudden death?"
Wisc. Med. J. 79/ 8 (1980) 24
- 27 FONIO A.
"Über ein neues Verfahren der Blutplättchenzählung"
Z. Chir. 117 (1912) 176
- 28 FURBERG C.D., MAY G.S., CHIR B.
"Clinical Trials of Platelet-active Drugs in Coronary Heart Disease: Summary of Design Features"
Circulation 62 Suppl. 5 (1980) 49
- 29 FUSTER V., CHESEBRO J.H.
"Role of Platelet-Inhibitor Drugs"
III. Management of Arterial Thromboembolic and Atherosclerotic Disease"
Mayo Clin. Proc. 66 (1981) 265
- 30 GENTON E.
"Cardiac Thromboembolism: Evidence for Role of Platelets and Value of Platelet Suppressant Therapy"
Bibl. Haematol. 44 (1978) 188
- 31 GENTON E., WILEY H.S., STEEL P.P.
"Platelets, thrombosis and coronary artery disease"
Adv. Cardiol. 9 (1973) 29

- 32 GENTON E.
"A Perspective of Platelet-suppressant Drug Treatment in Coronary Artery and Cerebrovascular Disease"
Circulation 62 Suppl. 5 (1980) 111
- 33 GIANITSIS D.J.
"Platelet Counting with a Laser Nephelometer"
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17 (1979) 537
- 34 GILES C.
"The Platelet Count and Mean Platelet Volume"
Br. J. Haematol. 48 (1981) 31
- 35 GROSS R., NIEMEYER G., REUTER H.
"Ein methodischer Beitrag zur Funktionsprüfung menschlicher Blutplättchen unter standardisierten Bedingungen"
Dtsch. Med. Wochenschr. 35 (1969) 1735
- 36 GROTHEMEYER K.H.
"Kollagen-Agarose-Test und Fibrinogen-Agarose-Test, ein Thrombozytenfunktionstestsystem auf der Basis von insolubilisiertem Kollagen und Rinderfibrinogen"
Inaugural-Dissertation, Gießen (1976)
- 37 HALUSHKA P.P., MAYFIELD R., WOHLTMANN H.J., ROGERS R.C., GOLDBERG A.K., MCCOY S.A., LOADHOLD C.B., COLWELL J.A.
"Increased platelet arachidonic acid metabolism in diabetes mellitus"
Diabetes 30 Suppl. 2 (1981) 44

- 38 HALUSHKA P.V., ROGERS R.C., LOADHOLT C.B., COLWELL J.A.
"Increased platet thromboxane synthesis in diabetes mellitus"
J. Lab. Clin. Med. 97 (1981) 87
- 39 HARKER L.A., RITCHIE J.L.
"The Role of Platelets in Acute Vascular Events"
Circulation 62 Suppl. 5 (1980) 13
- 40 HARRIS E.K.
"Statistical Principles underlying analytic Goal-setting"
Am. J. Clin. Pathol. 72 Suppl. (1979) 374
- 41 HEENE D.L., MATHIAS F.R.
"Adsorption of Fibrinogen Derivatives on Insolubilized Fibrin and Fibrinmonomer"
Thromb. Res. 2 (1973) 137
- 42 HEGGLIN R., SIEGENTHALER W.
"Differentialdiagnose innerer Erkrankungen"
Thieme Verlag, (1980) 5. 8
- 43 HEINRICH D.
"Immunreaktionen mit menschlichen Plättchen: Bemerkungen zur Pathogenese, Diagnostik und klinischen Relevanz"
in
"Prostaglandine und Plättchenfunktion"
hersch. v. BREDDIN H.K.
Schattauer Verlag (1978) 3

- 44 HIRSH J.
"Selection and Results of Antiplatelet Therapy in
the Prevention of Stroke and Myocardial Infarc-
tion"
Arch. Intern. Med. 141 (1981) 311
- 45 HÖFFLER U., OETTE K.
"Manuelle und mechanisierte Zähltechniken zur Be-
stimmung der Thrombozyten"
Med. Labor, 28, Heft 1 (1975) 6
- 46 HÖFFLER U., OETTE K.
"Vergleichende Untersuchungen über vier Thrombo-
zytenzählverfahren"
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12 (1974) 198
- 47 HOLME S., MURPHY S.
"Influence of platelet count and size on aggrega-
tion studies"
J. Lab. Clin. Med. 97 (1981) 623
- 48 HOLME S., SIMMONDS M., BALLEK R., MURPHY S.
"Comparative measurements of platelet size by
Coulter Counter, microscopy of blood smears, and
light-transmission studies"
J. Lab. Clin. Med. 97 (1981) 610
- 49 HOVIG T.
"The Role of Platelets in Thrombosis"
in
"Platelet Adhesion and Aggregation in Thrombosis"
herseg. v. MAMMEN, ANDERSON, BARNHART
Schattauer Verlag (1970) 137

- 50 INDUSTRIE INFORMATION
 "Methods for coupling ligands to CNBr-activated
 Sepharose 4B"
 aus
 "Affinity Chromatography"
 hersg. v. PHARMACIA FINE CHEMICALS
- 51 ISHIBASHI T., TANAKA K., TANIGUCHI Y.
 "Platelet Aggregation and Coagulation in the Pa-
 thogenesis of Diabetic Retinopathy in Rats"
 Diabetes 30 (1981) 601
- 52 JÖRG J.R., GROTHEMEYER K.H., LEHMANN H.J.
 "Konservative Therapie der akuten zerebrovaskulä-
 ren Insuffizienz"
 Dtsch. Ärztebl. 77 (1980) 1035
- 53 KAZMIER F.J., BOWIE E.J., O'FALLON W.M., ZIMMER-
 MANN B.R., OSMUNDSON P.J., PALUMBO P.J.
 "A Prospektive Study of Pheripheral Occlusive Ar-
 terial Disease in Diabetes. IV. Platelet and
 Plasma Functions"
 Mayo Clin. Proc. 56 (1981) 243
- 54 LAGARDE M., BERCIAUD P., BURTIN M., DECHAVANNE M.
 "Refractoriness of diabetic platelets to inhibi-
 tory prostaglandins"
 Prostaglandins Med. 7 (1981) 341
- 55 LAHAV J., MEYER F.A.
 "On the Role of the Major Platelet Membrane Glyco-
 proteins in Platelet Adhesion to Collagen"
 Thromb. Res. 22 (1981) 457

- 56 LECHLER E.
"Plättchenpharmaka: Wichtigste Indikationen und
ärztliche Überwachung"
in
"Kontrolle von Antithrombotika"
hersg. v. MARX R., THIES H.A.
Editiones "Roche" (1981) 231
- 57 LEGRAND Y.J., FAUVEL F., KARTALIS G., WAUTIER
J.L., CEN J.P.
"Specific and quantitative method for estimation
of platelet adhesion to fibrillar collagen"
J. Lab. Clin. Med. 94 (1979) 438
- 58 LEVIN R.D., KWAAN H.C., DOBBIE J.G., FETKENHOUR
C.L., TRAISMAN H.
"Partial purification and studies of the plasma
co-factor that potentiates platelet aggregation
in diabetes mellitus"
J. Lab. Clin. Med. 98 (1981) 519
- 59 LEYTIN V.L., LJUBIMOVA E.V., SVIRIDOV D.D., REPIN
V.S., SMIRNOV V.N.
"Time-Response Changes in the Thrombogenicity of
Platelets spread on an Collagen-Coated Surface"
Thromb. Res. 20 (1980) 335
- 60 LOELIGER E.A.
"Pro - Kontra: Antikoagulantien oder Thrombozy-
tenfunktionshemmer in der Prophylaxe des Herzin-
farktes?"
Internist 21 (1980) 397

- 61 MANNUCI P.M., SHARP A.A.
"Platelet Volume and Shape in Relation to Aggregation and Adhesion"
Br. J. Haematol. 13 (1967) 604
- 62 MANT M.J., BACH L.A.
"Platelet Adherence to Collagen: Effect of Erythrocytes"
Thromb. Res. 22 (1981) 513
- 63 MARX R.
"Die Thrombozytenfunktion und ihre Bedeutung für den Hämostasemechanismus"
Therapiewoche 18 (1968) 2103
- 64 MARX R., IBROM H., STANISLAWSKI F.
"Die Färbung folien- und glasadhärenter ausbreiteter Thrombozyten. Ein Verfahren zur verbesserten lichtmikroskopischen Analyse"
Blut 6 (1960) 335
- 65 MATHIAS F.R.
"Untersuchungen zur Frage der Beteiligung der Thrombozyten am thrombophilen Zustand nach akutem Herzinfarkt"
in
"Fibrinolyse, Thrombose, Hämostase"
herg. v. DEUTSCH E., LECHNER K.
Schattauer Verlag (1980) 132

- 66 MATSUMOTO M., NUKADA T., UYAMA O., YONEDA S.,
IMAIZUMI M., MIYAMATO T., KAYAMA N.
"Thromboxane generation in patients with essen-
tial hypertension or cerebrovascular disease and
effect of oral aspirin"
Thromb. Haemostasis 44 (1980) 16
- 67 MEHTA J., METHA P., PEPINE C.J., CONTO R.C.
"Platelet Function Studies on Coronary Artery Di-
sease"
Am. J. Cardiol. 47 (1981) 1111
- 68 MORIN R.J., CHEN A.F.T.
"Relationships of Adenine Nucleotide Metabolism
to Platelet-Collagen Adhesion"
Thromb. Haemostasis 39 (1978) 366
- 69 MÜHLHAUSER I., SCHERNTHANER G., SILBERBAUER K.,
KAINDL F.
"Erhöhte Plasma-Konzentrationen von β -Thromboglo-
bulin und Plättchenfaktor 4 bei koronarer Herz-
krankheit"
in
"Fibrinolyse, Thrombose, Hämostase"
hersch. v. DEUTSCH E., LECHNER K.
Schattauer Verlag (1980) 343
- 70 NORDØY A.
"Platelet Function Tests and Atherosclerosis in
Man"
in
"Platelet Function Testing"
hersch. v. DAY H.J., HOLMSEN H., ZUCKER M.B.
DHEW Publication No. (NIH) 78-1087

- 71 OSTENDORF P.
"Was ist gesichert in der Therapie mit Plättchen-
aggregationshemmern"
Internist 20 (1979) 585
- 72 PASCHEN K., BAUTZ W., BOHNER J.
"Anaerobe Serumultrafiltration - eine neue Metho-
de zur Bestimmung der Eiweißbindung von Parmaka
unter physiologischen Bedingungen"
Arzneim.-Forsch. 26 (1976) 2137
- 73 PASCHEN K.
"Die Bestimmung des Calciums und seiner Fraktio-
nen im Serum, Methoden, Normalwerte und klinische
Bedeutung"
Thieme-Copythek, Georg Thieme Verlag (1975)
- 74 PERLICK E.
"Gerinnungslaboratorium in Klinik und Praxis"
VEB Georg Thieme Verlag Leipzig (1971)
- 75 PERNIGOTTI L., MOLASCHI M., MACCIONE C., FERRARIO
E., POLI L.
"Aggregabilit a piastrinica da ADP nelle vasculo-
pathie dell'anziano"
Minerva Med., 72 (1981) 2617
- 76 PHILP R.B.
"Experimental Animal Models of Arterial Thrombo-
sis and the Screening of Platelet-Inhibiting, An-
ti-Thrombotic Drugs: A Review"
Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 1 (4) (1979)
197

- 77 PODOLSAK B., WENZEL E., BRILL G., NIENHAUS K.H.,
 MONADJEMI H.
 "Bedeutung unterschiedlicher Thrombozytenvolumi-
 na für die Standardisierung von Plättchenfunktionsproben"
 in
 "Prostaglandine und Plättchenfunktion"
 herg. v. BREDDIN H.K.
 Schattauer Verlag (1978) 171
- 78 PRIES K., BARTHELS M., POLIWODA H.
 "Methodische Untersuchungen und Ergebnisse von
 Patienten bei der radio-immunologischen Bestimmung
 von Plättchenfaktor 4 und Beta-Thromboglobulin"
 in
 "Fibrinolyse, Thrombose, Hämostase"
 herg. v. DEUTSCH E., LECHNER K.
 Schattauer Verlag (1980) 339
- 79 REIMERS H.J., SCHNEIDER W.
 "Methoden zur Erfassung einer gesteigerten Thrombo-
 zytenfunktion"
 in
 "Prostaglandine und Plättchenfunktion"
 herg. v. BREDDIN H.K.
 Schattauer Verlag (1978) 73
- 80 REIMERS H.J., MISERA R., SCHNEIDER W., LOOGEN F.
 "Thrombozyten und koronare Herzkrankheit"
 Z. Kardiol. 69 (1980) 799

- 81 REUTER H.D.
"Pro - Kontra: Aggregationshemmer in der Prophylaxe des Herzinfarktes"
Internist 21 (1980) 390
- 82 RICHTERICH R., COLOMBO J.P.
"Klinische Chemie"
S. Karger Verlag (1978)
- 83 ROCK G., TITTLE P., SHERRING V., CULLEY C., WONG S.C.
"Platelet Storage: An Assessment of the Requirements for Plasma and Oxygen"
Transfusion 21 (1981) 167
- 84 SACHS L.
"Statistische Auswertungsmethoden"
Springer Verlag (1972)
- 85 SALZMAN E.W., ROSENBERG R.D., SMITH M.H., LINDON J.N., FAVREAU L.,
"Effect of Heparin and Heparin Fractions on Platelet Aggregation"
J. Clin. Invest. 65 (1980) 64
- 86 SANTARO S.A., CUNNINGHAM L.W.
"Collagen-Mediated Platelet Aggregation: The Role of Multiple Interactions between the Platelet Surface and Collagen"
Thromb. Haemostasis 43 (1980) 158
- 87 SCHMID-SCHÖNBEIN H., GRUNAU G., BRÄUER H.
"Exempla Hämorreologica"
Albert-Roussel Pharma GmbH (1980)

- 88 SCHMID-SCHÖNBEIN H., RIEGER H., WURZINGER L.
"Gesteigerte Erregbarkeit von Blutplättchen als
Ursache gesteigerter Plättchenaggregation: die
aktive Beteiligung der Plättchen an der Aggrega-
tion"
in
"Prostaglandine und Plättchenfunktion"
herg. v. BREDDIN H.K.
Schattauer Verlag (1978) 161
- 89 SCHNEIDER W., REIMERS H.J., MORGENSTERN E.
"Thrombozytenstoffwechsel"
in
"Prostaglandine und Plättchenfunktion"
herg. v. BREDDIN H.K.
Schattauer Verlag (1978) 19
- 90 SCHULZ V., KÖSTERING K., WALTER CH., KOCHSIEK K.
"Nephelometrische Plättchenzählung. Ein neues
Verfahren zur Bestimmung der Thrombozytenzahl"
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 9 (1971) 329
- 91 SEUTER F.
"Biochemische Wirkungen von Plättchenpharmaka"
in
"Kontrolle von Antithrombotika"
herg. v. MARX R., THIES H.A.
Editiones "Roche" (1981) 223
- 92 SHANKER A., GAUR K.J.B.S., AMED K.A., LAHA N.N.
"A Study of Platelet Adhesiveness in Myocardial
Infarction and Ischaemic Heart Disease"
Indian Heart J. 30 (1978) 277

- 93 SHARMA S.C.
"Platelet adhesiveness, plasma fibrinogen, and
fibrinolytic activity in juvenile-onset and ma-
turity-onset diabetes mellitus"
J. Clin. Pathol. 34 (1981) 501
- 94 SHARMA S.C., SAINI J.S.
"Platelet adhesiveness, plasma fibrinogen and fi-
brinolytic activity in Hypertension"
J. Assoc. Physicians India 29 (1981) 359
- 95 SHATTIL S.J., BENNETT J.S.
"Platelets and Their Membranes in Haemostasis:
Physiology and Pathophysiology"
Ann. of Int. Med. 94 (1980) 108
- 96 SIESS W., ROTH P., WEBER P.C.
"Thromboxan (TX)-Bildung und Thrombozytenaggrega-
tion in vitro: Messung und möglicher funktionel-
ler Zusammenhang"
in
"Fibrinolyse, Thrombose, Hämostase"
herschg. v. DEUTSCH E., LECHNER K.
Schattauer Verlag (1980) 273
- 97 SILBERBAUER K., SCHERNTHANER G., SINZINGER H.,
FREYLER H.
"Platelet aggregation and reversible platelet ag-
gregates in type I-diabetes staged by retinal
fluorescein angiography"
Atherosclerosis 40 (1981) 81

- 98 SILBERBAUER K., SCHERNTHANER G.
"β-Thromboglobulin (β-TG) und Plättchenfaktor 4"
in
"Fibrinolyse, Thrombose, Hämostase"
herg. v. DEUTSCH E., LECHNER K.
Schattauer Verlag (1980) 188
- 99 SINZINGER H., KALIMAN J., WIDHALM K., PACHINGER O., PROBST P.
"Value of platelet sensitivity to antiaggregatory prostaglandins"
Prostaglandins Med. 7 (1981) 125
- 100 SLOAN R.W.
"Antiplatelet therapy"
Am. Fam. Physician 24 (1981) 129
- 101 STEWART B.C., WOJIC J.D., VAN HORN D.L., JOHNSON S.A.
"Endothelial Supportive Function of Platelets"
in
"Platelet Adhesion and Aggregation in Thrombosis"
herg. v. MAMMEN, ANDERSON, BARNHART
Schattauer Verlag (1970) 125
- 102 THOMAS L.
"Labor und Diagnose"
Medizinische Verlagsgesellschaft (1978)
- 103 VESTER F.
"Neuland des Denkens"
DVA (1980)

- 104 VINAZZER H.
"Gerinnungsphysiologie und Methoden im Blutgerinnungslaboratorium"
Gustav Fischer Verlag (1979)
- 105 WALTER E., WEBER E.
"Pro-Kontra: Aggregationshemmer in der Prophylaxe des Herzinfarktes"
Internist 21 (1980) 387
- 106 WALTER E., WEBER E., REUTER H.D.
"Aggregationshemmer in der Prophylaxe des Herzinfarktes"
Internist 21 (1980) 393
- 107 WEISBERG G.
"Fehleranalyse und Optimierung der Thrombozytenzählung"
Inaugural-Dissertation, Köln (1973)
- 108 WEISS H.J.
"Platelet-active Drugs in the Secondary Prevention of Cardiovascular Events: An Overview"
Circulation 62 Suppl. 5 (1980) 41
- 109 WERTZ R.K., TRIPPLETT D.
"A Review of Platelet Counting Performance in the United States"
Am J. Clin. Pathol. 74 Suppl. (1980) 575

- 110 WHITE J.G., HAGERT K., NIPPER J.H.J., RAO G.H.J.
"Functional Platelets After Storage in Vitro for
15-21 Days"
Am. J. Pathol. 101 (1980) 613
- 111 WÖRENER P., PATSCHEKE H.
"Steigerung der Thrombozytenreaktivität durch Be-
handlung mit cholesterinreichen Phospholipiddis-
persionen in vitro"
in
"Fibrinolyse, Thrombose, Hämostase"
hersg. v. DEUTSCH E., LECHNER K.
Schattauer Verlag (1980) 690
- 112 v. ZILE J., KILPATRICK M., LAIMINS M., SAGAL J.,
COLWELL J., VIRELLE G.
"Platelet Aggregation and Release of ATP after
Incubation with Soluble Immune Complexes Purified
from the Serum of Diabetic Patients"
Diabetes 30 (1981) 575
- 113 ZUCKER M.B.
"Effect of Heparin on Platelet Function"
Thromb. Diath. Haemorrh. 33 (1974) 63

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von

Frau Dr. med. G.E. Rindfleisch

am Institut für Klinische Chemie im Klinikum Großhadern
(Direktor: Prof. Dr. med. M. Knedel) durchgeführt.

Frau Dr. G.E. Rindfleisch gilt mein Dank für ihre stete Betreuung. Ihre Diskussionsbereitschaft sowie ihre sachgerechte, konstruktive Kritik waren entscheidende Voraussetzungen für den erfolgreichen Abschluß der vorliegenden Dissertation.

Herrn Prof. Knedel danke ich für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten in seinem Institut.

Herrn Prof. Dr. G. Riecker (Medizinische Klinik I im Klinikum Großhadern der LMU München) und Herrn Prof. Dr. E. Standl (3. Medizinische Abteilung des Städtischen Krankenhauses München Schwabing) möchte ich für die Überlassung der Patientenblutproben danken.

Allen Mitarbeitern unseres Institutes, die durch viele Gespräche und Anregungen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und nicht namentlich genannt sind, sei ebenfalls gedankt.

LEBENS LAUF

Geboren wurde ich am 31.10.1958 in Bonn als Sohn des Diplom-Volkswirts Helmut Tschöpe und seiner Ehefrau Lore, geb. Schorn.

1965 wurde ich eingeschult und besuchte die Katholische Volksschule in Bonn-Beuel bis mein Vater 1966 beruflich nach München versetzt wurde.

Nach der vierten Klasse in der Volksschule an der Fürstenrieder-Straße in München trat ich im Jahre 1969 nach bestandener Aufnahmeprüfung in das humanistische Ludwigsgymnasium über.

Im Juni 1977 beendete ich diesen Ausbildungsabschnitt mit dem Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife. Mit Aufnahme des Studiums der Humanmedizin im Wintersemester 1977/78 an der Ludwig Maximilians-Universität konnte ich meine Ausbildung ohne Verzögerung fortsetzen.

Nach bestandener Ärztlicher Vorprüfung im Sommer 1979 legte ich im August 1980 den ersten Abschnitt und im August 1982 den zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab.

Nach einjähriger praktischer Ausbildung in den Fächern Pädiatrie, Innere Medizin (Schwerpunkt: Endokrinologie und Stoffwechsel) und Chirurgie erlangte ich mit Bestehen des dritten medizinischen Staatsexamens Ende 1983 die ärztliche Approbation.

Im Januar 1981 begann ich im Institut für klinische Chemie im Klinikum Großhadern der Universität München (Leiter: Prof. Dr. M. Knedel) mit der Arbeit an der vorliegenden Dissertation.

